

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E. A. P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**“EFECTO DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A
CAMPOS MAGNÉTICOS DE BAJA
FRECUENCIA EN LAS CÉLULAS
GERMINALES DE RATÓN”**

TESIS

Para optar el título profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga

AUTOR

Gloria Maria Magdalena Levano Sanchez

ASESOR

Martha Esther Valdivia Cuya

Lima – Perú

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE GENÉTICA Y

BIOTECNOLOGÍA

**“EFECTO DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A CAMPOS
MAGNÉTICOS DE BAJA FRECUENCIA EN LAS CÉLULAS
GERMINALES DE RATÓN”.**

Tesis para optar al Título profesional de Bióloga Genetista
Biotecnóloga.

Bach. GLORIA MARIA MAGDALENA LEVANO SANCHEZ

Asesor: Mg .Martha Esther Valdivia Cuya

LIMA-PERU

2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a las personas que admiro infinitamente, a mis padres: Gloria y Pedro; por ser un ejemplo de sacrificio y amor, ante más adversidades en la vida, siempre la fe y el amor nos mantiene unidos y con la esperanza de volvernos a ver, gracias a ustedes pude seguir mis sueños.

Gracias Papá por el enorme sacrificio, el tiempo dice que ya paso once años, mi corazón, mi mente recuerda el “ya regreso”, sigo esperando y seguiré haciéndolo todos los días, aun con todas las adversidades que se han presentado y se seguirán presentando batallaremos juntos,

También quisiera agradecer a mis hermanos: Pedro y Milagros por sus palabras, sus sonrisas por ser aquello que me impulsa a seguir, a mi abuelita Gregoria y a mis tíos Porfirio e Imelda por el amor, dedicación y fé en mí como persona y profesional. A mis tíos Milciades, Eddy, Linder por siempre confiar en mí y darme aliento en todo momento. Y a mis queridos primos: Magaly, Luis, Marco, Karin, Renato y Paquito, por ser como son: maravillosos .A mi prima Mariella, eres una vencedora.

A mis amigos : Angellos , Claudia , Nataly ,Sergio ,Diego, Edith , Lyz ,Elaine , Josué, aun a la distancia y aunque los años pasen ,su apoyo incondicional , su amor y nuestra amistad es inquebrantable.

A mi asesora Mg Martha Esther Valdivia Cuya por abrirme las puertas del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal, incentivarme a investigar y por el apoyo constante e incondicional al desarrollo de mi tesis.

A la profesora Haydee Temoche, gracias por su apoyo desde siempre, por su ayuda y su amistad.

Al Mg Fidel Mujica Lengua, que junto a los integrantes del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal: Karen, Giselle, Pault, Andree fueron parte muy importante en desarrollo de mi tesis .

A FARVET, en especial al Dr. Manolo Fernández, por abrirme las puertas del Laboratorio de Inmunología, asimismo a los Doctores Ivan Best y Waldo Medina quienes me apoyaron en el Laboratorio de Inmunología por la paciencia y espíritu científico.

En especial a Dios por guiarme siempre en la vida , por llenar mi camino de amor ,por darme una familia maravillosa y amigos a los que puedo llamar hermanos .

Un especial agradecimiento al Fondo de promoción de Trabajo de Tesis del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Mayor Nacional de San Marcos por el financiamiento para poder terminar satisfactoriamente el presente trabajo.

DEDICATORIA

*A mi familia, por todo su amor, esfuerzo y
sacrificio, por ustedes seguiré en el camino hacia
mis sueños, son la razón de mi vida.*

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II.MARCO TEORICO	5
2.1. Espermatogénesis, células madre y células madre espermátogonias	5
2.2 Espermatogénesis y muerte celular programada	8
2.3. Campos electromagnéticos, radiaciones ionizantes y radiaciones no ionizantes	9
2.4. Campos magnéticos	12
2.5. Clasificación de los campos magnéticos	13
2.5.1. Campos magnéticos estáticos	13
2.5.2 Campos magnéticos de baja frecuencia	13
2.5.3. Campos magnéticos de frecuencia intermedia	13
2.5.4. Campos de radiofrecuencia	13
2.6. Características de los campos magnéticos de frecuencia	13
2.7 Campos magnéticos de baja frecuencia y su efecto en la reproducción	14
2.8. Lectinas de Dolichos Biflorus glutinina (DBA)	15
III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	16
3.1 Hipótesis	16
3.2 Objetivo general	16

3.3	Objetivos específicos	16
IV	MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1. 1.	Material de Laboratorio	16
4.1.2.	Material biológico	18
4.2	.Metodología	18
4.2.1	Sistema generador de campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja para exposición In vivo (CEM-ELF)	18
4.2.2	Sistemas de exposición a campos magnéticos basados en bobinas de Helmholtz	19
4.2.3.	Diseño del sistema de exposición a campos magnéticos	19
4.2.4	Exposición a campos magnéticos	20
4.2.5.	Procedimiento experimental	20
4.2.5.1.	Aislamiento de Células madre espermátogonias (SSC)	22
4.2.5.2	Concentración de células madres espermátogonias	24
4.2.5.3.	Viabilidad de células madres espermátogonias	24
4.2.5.4	Fijación de las células madre espermátogonias	24
4.2.5.5.	Citometría de flujo	24
4.2.5.6.	Parámetros espermáticos	25
4.2.5.7.	Movilidad espermática	25
4.2.5.8	Concentración espermática	25
4.2.5.9.	Vitalidad espermática	26
4.2.5.10.	Integridad de membrana plasmática (Test de HOST)	26
V.	RESULTADOS	27
V.I	Aislamiento de células madres	27

5.2 Resultados de concentración y viabilidad de las células madre espermátogonias de ratón	28
5.3. Resultados de la movilidad, concentración, vitalidad e integridad de la membrana	31
5.3.1 Concentración de espermatozoides	31
5.3.2 Viabilidad de espermatozoides	32
5.3.3 Integridad de membrana (HOST) de espermatozoides	33
5.3.4 Movilidad espermática	34
5.4 Resultados de la citometría de flujo	36
5.4.1 .Resultados de la citometría de flujo de los grupos I y II	36
5.4.2 .Resultados de la citometría de flujo de los grupos III y IV	39
5.4.3. Resultados de la citometría de flujo de los grupos V y VI	42
VI. DISCUSION	43
VII.CONCLUSIONES	47
VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
IX ANEXOS	52

ÍNDICE DE FIGURAS.

Fig. Nº 1. Esquema de la multiplicación de espermatogonias y la renovación de células madre en ratones. El esquema comienza con las células madre espermatogoniales y la autorrenovación a Apr (paired). Aal: espermatogonias alineados. Después de una serie de 9-11 divisiones (flechas rojas), son formados los espermatoцитos. Las flechas de color azul indican un paso diferenciación que no implica una división (Rooij D.G, 2001). 8

Fig. Nº 2. Sistemas de exposición a campos magnéticos basados en bobinas de Helmholtz. 19

Fig. Nº 3. Flujoograma de los grupos de estudio y metodología. 21

Fig. Nº 4. Metodología del aislamiento de células madre espermatogoniales de ratón. a. Ratones de 14 dpp. b. Disección de los testículos. c. Aislamiento de los testículos. d. Lavado de las muestras de los testículos. e. Primera digestión enzimática. f. Incubación de las muestras a 37°C. g. Segunda digestión enzimática. h. Incubación de las muestras a 37°C. i. Observación de las muestras al microscopio invertido. 23

Fig. Nº 5. Células madre espermatogoniales de tipo A en varias etapas (a –e). (a) Se observa la presencia de aglutinación de células (clumps), acompañadas de células espermatogoniales de tipo A (flechas moradas). (b-e) Células madres espermatogoniales grandes (flecha morada) y pequeñas (flecha verde) y células somáticas (flecha roja). Barra de escala representa (b-d) 22,0µm y (e) 5µm. 27

Fig. Nº6. Gráficas de las medias de la concentración y vitalidad de los grupos 1 y 2. Las barras de error indican la desviación estándar. (a) Gráfica de la media de la concentración de las células madre espermatogoniales (b) Gráfica de la media de la vitalidad de células madre espermatogoniales. (*)Indica diferencias significativas. 28

Fig. Nº7. Gráficas de las medias de la concentración y vitalidad de los grupos 1 y 3. Las barras de error indican la desviación estándar. (a) Gráfica de la media de la concentración de las células madre espermatogoniales (b) Gráfica de la media de la vitalidad de células madre espermatogoniales. (*)Indica diferencias significativas. 29

Fig. Nº8. Gráficas de las medias de la concentración y vitalidad de los grupos 5 y 6. Las barras de error indican la desviación estándar. (a) Gráfica de la media de la concentración de las células madre espermatogoniales (b) Gráfica de la media de la vitalidad de células madre espermatogoniales. (*)Indica diferencias significativas. 30

Fig. Nº9. Gráficas de las medias de la concentración y vitalidad de los grupos 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Las barras de error indican la desviación estándar. (a) Gráfica de la media de la concentración de las células madre espermatogoniales (b) Gráfica de la media de la vitalidad de células madre espermatogoniales. 31

Fig. Nº10 .Gráfica de las medias de la concentración de los grupos III, IV, V, VI. 32

Fig. Nº11 .Gráfica de las medias de la viabilidad de los grupos III, IV, V, VI. 33

Fig. Nº12 .Gráfica de las medias de la integridad de membrana de los grupos III, IV, V, VI. 34

Fig. Nº13 .Gráfica de las medias de la movilidad espermática de los grupos III, IV, V, VI. 35

Fig. 14. (a, b, c y d). Distribución de la fluorescencia de Dolichos biflorus aglutinina (DBA) después de la tinción con DBA–fluoresceina isotiosanato (DBA-FITC). Representación gráfica de puntos que muestran las subpoblaciones A y B de células marcadas con DBA-FITC en función de su tamaño o de la intensidad de fluorescencia. El eje X representa el tamaño de la célula medida por dispersión frontal, en contra de la dispersión lateral (SSC) representada en el eje Y; (b) la fluorescencia se mide por dispersión frontal (FSC) frente a FITC. (a y b) representan individuos del grupo I y (c, d y e),individuos del grupo II. 37

Fig. 15. (a, b, c y d). Distribución de la fluorescencia de Dolichos biflorus aglutinina (DBA) después de la tinción con DBA–fluoresceina isotiosanato (DBA-FITC). Representación gráfica de puntos que muestran las subpoblaciones A(color rojo) y B(color azul) de células marcadas con DBA-FITC en función de su tamaño o de la intensidad de fluorescencia en los histogramas. El eje X representa el tamaño de la célula medida por dispersión frontal, en contra de la dispersión lateral (SSC) representada en el eje Y; (b) la fluorescencia se mide por dispersión frontal (FSC) frente a FITC. (a y b) representan individuos del grupo III y (c, d y e),individuos del grupo IV. 38

Fig. 16. Distribución de la fluorescencia de Dolichos biflorus aglutinina (DBA) después de la tinción con DBA–fluoresceina isotiosanato (DBA-FITC). a, Células marcadas con DBA –FITC , A y B, representan las subpoblaciones de células madres espermato goniales del Grupo V. b, Células marcadas con DBA –FITC , A y B, representan las subpoblaciones de células madres espermato goniales del Grupo VI.40

Fig. 17. Distribución de la fluorescencia de Dolichos biflorus aglutinina (DBA) después de la tinción con DBA–fluoresceina isotiosanato (DBA-FITC). Representación gráfica de puntos que muestran las subpoblaciones A(color rojo) y B(color azul) de células marcadas con DBA-FITC en función de su tamaño o de la intensidad de fluorescencia en los histogramas.. El eje X representa el tamaño de la célula medida por dispersión frontal, en contra de la dispersión lateral (SSC) representada en el eje Y; la fluorescencia se mide por dispersión frontal (FSC) frente a FITC. Se representa 1 individuo por cada grupo de los 6 grupos en estudio (grupos I, II, III, IV, V y VI) . 41

Fig. Nº18. (a y b) Distribución de la fluorescencia de Dolichos biflorus aglutinina (DBA) después de la tinción con DBA–fluoresceina isotiosanato (DBA-FITC).a, Células marcadas con DBA –FITC , A(rojo) y B(azul), representan las subpoblaciones de células madres espermato goniales del Grupo V .b, Células marcadas con DBA –FITC

, A y B, representan las subpoblaciones de células madres espermatogoniales del Grupo VI.(c y d) Porcentaje de células madres espermatogoniales positivas al DBA.(a)Porcentaje de células positivas al DBA.(b)Subpoblaciones A y B . Porcentaje de las subpoblaciones Alta afinidad (barra roja) y baja afinidad (barra azul). 42

RESUMEN

Los posibles efectos adversos de los campos magnéticos sobre la salud reproductiva y el desarrollo han sido estudiados en modelos animales y humanos en las últimas décadas debido a su uso masificado en aparatos de uso cotidiano y doméstico.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de los campos magnéticos de baja frecuencia, en las células madre espermato goniales de ratones de edad temprana y adulta. Con ese fin se trabajaron con seis grupos, los dos primeros grupos fueron los de análisis de edad temprana, grupo I: ratones de 14dpp sin exposición a campos magnéticos, grupo II: ratones de 4dpp expuestos durante 10 días a campos magnéticos de 50-60 Hz ,800 μ T, y los grupos de diferenciación *in vivo* grupo III :diferenciación *in vivo* de los ratones del grupo II , y grupo IV: diferenciación *in vivo* de los ratones del grupo ,ambos grupos fueron analizados a los 73 dpp. También se analizaron los grupos de edad adulta y exposición crónica; grupo V: ratones de 77 dpp y Grupo VI: ratones de 35 días expuestos durante 35 días a campos magnéticos de 50-60 Hz ,800 μ T.

Se realizó el aislamiento de las células madre espermato goniales y la evaluación de la concentración, la viabilidad y el porcentaje de células positivas al DBA, que es un marcador de células madres.

Los resultados indicaron que el efecto negativo de los campos magnéticos es más evidentes en ratones en edad temprana (14dpp.), el grupo I, presento una concentración de $25,62 \pm 2,51$ células $\times 10^6$ / ml y una viabilidad de $59,00 \pm 8,94$ % y una disminución significativa ($P < 0.05$) en el grupo II, ratones con exposición a campos magnéticos los valores de concentración y viabilidad fueron respectivamente de $12,15 \pm 3,55$ células $\times 10^6$ / ml y $42,00 \pm 7,58$ % .Los resultados indicaron que las células madre espermato goniales de ratones expuestas a campos magnéticos de baja frecuencia son afectados principalmente en edad temprana.

Palabras clave: Campos magnéticos de baja frecuencia, células madre espermato goniales, DBA.

ABSTRACT

Possible adverse effects of magnetic fields on reproductive health and development have been studied in animal models and humans in recent decades due to its crowded in everyday appliances and household use.

The aim of this study was to evaluate the effect of low frequency magnetic fields in the spermatogonial stem cells of mice and early adulthood. To that end they worked with six groups, the first two groups were the early analysis, group I: 14dpp mice without exposure to magnetic fields, group II: 4dpp mice exposed for 10 days to magnetic fields 50-60 Hz, 800 mT, and groups in vivo differentiation group III mice in vivo differentiation of Group II and Group IV mice in vivo differentiation group, both groups were analyzed at 73 dpp. Adult age groups and chronic exposure were also analyzed; Group V: 77 dpp mice and Group VI: 35 days mice exposed for 35 days at 50-60 Hz magnetic fields of 800 mT.

Isolation of spermatogonial stem cells and evaluation of the concentration, viability and the percentage of positive cells DBA, which is a marker of stem cells was performed. The results indicated that the negative effect of magnetic fields is more evident in mice at an early age (14dpp.), Group I presented a concentration of $25.62 \pm 2.51 \times 10^6$ / ml cells and viability of $59.00 \pm 8.94\%$ and a significant ($P < 0.05$) in Group II, mice with magnetic field exposure values of concentration and viability were respectively $12.15 \pm 3.55 \times 10^6$ cells / ml and $42.00 \pm 7.58\%$. The results indicated that the spermatogonial stem cells of mice exposed to low frequency magnetic fields are affected mainly young age.

Keywords: low-frequency magnetic fields, spermatogonial stem cells, DBA.

I. INTRODUCCIÓN

La investigación del efecto de las ondas y los campos magnéticos sobre la salud ,es una línea de investigación en pleno desarrollo dado que se encuentran presentes en la vida cotidiana del hombre, una clase de campos magnéticos, son los campos magnéticos de baja frecuencia, donde el cuerpo humano es conductor eléctrico.

Los estudios bibliográficos sobre los campos electromagnéticos de extremadamente baja frecuencia (ELF) y los seres vivos revelan, a partir de modelos experimentales, las siguientes patologías: modificaciones del comportamiento, disfuncionamiento neuroendocrino, alteraciones inmunológicas, modificaciones de la síntesis de proteínas, anomalías del ADN modificación de los flujos de iones calcio, etc. (Piquemal 2006)

Estos campos, son a los que estamos expuestos diariamente y (electrodomésticos, ordenadores etc.) están relacionados con problemas reproductivos, existiendo daño a nivel de la espermatogénesis (Furuya *et al.* 1998, De Vita *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2004).

En estudios previos se analizaron los efectos de los campos de baja frecuencia, en el desarrollo diferenciación *in vivo* y de las células madre espermatogoniales (SSC), las cuales tienen capacidad de autorrenovación y diferenciación en células de la línea germinal, por lo que un daño en éstas, afectaría la diferenciación de los espermatozoides. Para ello se realizó la diferenciación *in vivo* de las células madres espermatogoniales (SSC). Para el estudio se utilizó un marcador de células madres DBA-FITC que es un conjugado de lectina, que tienen alta afinidad a epítomos de glicano presentes en la membrana celular (Nash *et al* ,2006).

Cabe resaltar que no existe en la literatura, trabajos previos de exposición a campos magnéticos de 715 μT y 50 Hz en donde se concluya la edad en que hay mayor susceptibilidad a los campos magnéticos.

II-MARCO TEÓRICO.

2.1. Espermatogénesis, células madre y células madre espermatogoniales

La espermatogénesis en los mamíferos es dinámica, pero a la vez es un proceso altamente ordenado que involucra numerosos pasos de diferenciación, que conducen a la producción del gameto masculino.

Este proceso comprende varias etapas, cada una caracterizada por una bien definida asociación celular. Cada especie, posee diferente duración de la espermatogénesis con un determinado número de etapas, como una característica específica.

En cada una de estas etapas, tiene lugar la proliferación de las espermatogonias, espermátocitos, las cuales luego de la división meiótica se diferencian en espermátidas interactuando unas con otras y con las células de Sertoli, que proporcionan apoyo físico y metabólico para las células germinales vecinas. La espermatogénesis tiene lugar de tal manera que cada etapa evoluciona de la anterior etapa con el tiempo a la siguiente etapa (J. Blanco-Rodríguez, 1998).

La espermatogénesis, es un proceso bien caracterizado en organismos adultos, el proceso se inicia cuando una célula madre espermatogonial primitiva de tipo A , se activa cuando entra en mitosis y forma más de un tipo de espermatogonias diferenciadas, que maduraran y darán origen al espermátocito que en la meiosis y finalmente se diferenciará en espermatozoide. La producción continua de los espermatozoides durante toda la vida de un hombre adulto depende el establecimiento de una célula madre espermatogonial omnipotente en una población. El número de células madre espermatogoniales en el testículo del ratón adulto es baja; 0,02% de todas las células germinales testiculares (Tegelenbosch R, *et al* 1993).

La presencia de las células madres espermato goniales en la población celular puede ser evaluada mediante el trasplante de células en azoospermicos (Brinster RL. *et al* 2002, McLean DJ *et al* 2001).

Las células madre (SC, del inglés, Stem Cells) están definidas por la capacidad de autorrenovarse y reemplazarse a sí mismas, la capacidad de diferenciarse en uno o más linajes o tipos celulares especializados y el enorme potencial proliferativo para renovarse y mantener los tejidos en los que se encuentran (Gargett CE, 2007). Existen dos tipos de divisiones que pueden sufrir las SCs, divisiones simétricas y divisiones asimétricas. Las primeras comprenden a su vez dos posibilidades, una división simétrica que dé lugar a dos SSC o bien que genere dos células progenitoras que posteriormente se diferenciarán hacia algún linaje celular. Las divisiones asimétricas generarán una SC y una célula progenitora. El compromiso de la célula progenitora formada hacia una determinada diferenciación puede ser adquirido de dos maneras, (i) que los determinantes de destino celular en la SC estén distribuidos asimétricamente y heredados de forma mayoritaria por la célula progenitora, o por el contrario, (ii) que sea la salida del microambiente la que determine el inicio de la diferenciación (Wilson A *et al*, 2006).

Las SCs adultas de los testículos, llamadas células madre espermato goniales (SSCs, del inglés, Spermatogonial Stem Cells), están localizadas en la periferia de los túbulos seminíferos rodeadas por las células de Sertoli. Desde la pubertad, las SSCs empiezan a diferenciarse y a producir espermatozoides maduros. Este proceso de espermatogénesis ocurre durante toda la vida reproductiva del hombre, y está asegurado por la capacidad de autorrenovación de las SSCs (Ellen G *et al*, 2007).

Las SSCs provienen de las células madre primordiales (PGCs, del inglés, Primordial Germ Cells), las cuales derivan de las células epiblasticas pluripotentes (Ellen G *et al*, 2007). Tras la migración de las PGCs a las crestas gonadales, donde proliferan e incrementan su número (Hogan B *et al*, 1994), se diferencian en gonocitos al quedar

localizadas en los cordones seminíferos, gonocitos proliferan durante un tiempo, se vuelven quiescentes y reanudan su actividad durante la primera semana postnatal.

La diferenciación germinal en los testículos de ratón comienza desde una pequeña población de células ($2-3 \times 10^4$ células por testículo adulto) llamadas espermatogonias As (del inglés, Asingle), estas pueden dividirse en dos nuevas células madres o en la célula Apr (del inglés, Apaired), que produce células hijas que permanecen conectadas después de la mitosis. Las células, Apr están predestinadas a desarrollarse luego de una serie de divisiones mitóticas en las células Aa (del inglés, Aaligned), que seguirán conectadas por puentes citoplasmáticos pudiendo generarse cadenas de más de 16 células (De Rooij DG *et al.*, 1998).

De Rooij D,G en el 2001 describió que la espermatogénesis es un proceso cíclico que, en ratones, puede ser dividida en 12 etapas (I-XII). En la etapa VIII, As, Apr y algunas Aal espermatogonias, están presentes, desde la etapa X en adelante, estas células comienzan a proliferar de tal manera que los números de células As y células Apr se mantienen relativamente constante y cada vez más Aa espermatogonias son formadas. Alrededor de las etapas II-III (XII etapa es seguido por la etapa I), la proliferación se detiene en la fase G1-G0. Posteriormente, en las etapas VII-VIII, sin división, casi todas las espermatogonias Aal que se formaron durante el período de proliferación activa se diferencian en espermatogonias A1. Las espermatogonias A1 entran en la fase S y, en la etapa IX, se dividen en espermatogonias A2, después de lo cual hay cinco divisiones posteriores en A3, A4, y en espermatogonias tipo B y en espermatocitos primarios, respectivamente. En total, hay 9-11 divisiones mitóticas durante el desarrollo espermatogonial (Fig. Nº 1).

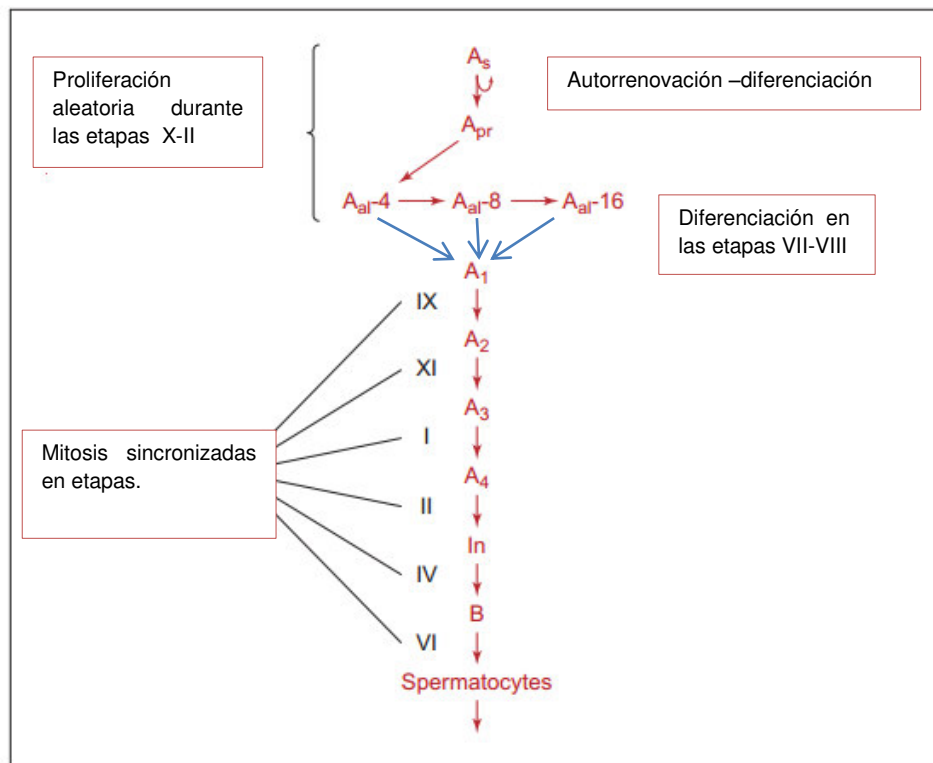


Fig. Nº 1. Grafico modificado de la Espermatogénesis de Ratón De Rooij DG 2001 de la multiplicación de espermatogonias y la renovación de células madre en ratones. El esquema comienza con las células madre espermatogoniales y la autorrenovación a A_{pr} (paired) A_{al} : espermatogonias alineados. Después de una serie de 9-11 divisiones (flechas rojas), son formados los espermatoцитos. Las flechas de color azul indican un paso diferenciación que no implica una división.

2.2 Espermatogénesis y muerte celular programada.

La espermatogénesis en mamíferos es un proceso complejo que depende de la estimulación hormonal, así como de la interacción dinámica entre las células de Sertoli, las células somáticas y los componentes del epitelio seminífero, y las células germinales.

De hecho, en el testículo, la diferenciación de las espermatogonias a espermatozoides maduros, están en estrecho contacto con las células de Sertoli, que es el suministro de nutrientes y de las hormonas esenciales para el éxito de las señales en la espermatogénesis (Blanco-Rodríguez, 1998).

La muerte celular programada juega un rol importante en el balance de la proporción de células germinales y células de Sertoli. En el testículo adulto, la apoptosis es un proceso fisiológico normal para la eliminación de células germinales con defectos genéticos o daños al ADN causados por la exposición a productos químicos o irradiación (Yan et al ,2000).

La muerte espontánea de las células germinales se produce normalmente durante la espermatogénesis por el proceso llamado muerte celular programada o apoptosis, que supone la pérdida de hasta el 75% del número potencial de espermatozoides, probablemente como un mecanismo fisiológico que limita la expansión clonal de las células germinales y la liberación de los espermatozoides. Este proceso ha estimulado una serie de estudios *in vivo* e *in vitro*, de los investigadores que trabajan en el ámbito de la endocrinología reproductiva masculina y toxicología, con el objetivo de definir los mecanismos celulares y moleculares de la apoptosis espontánea e inducida por toxicidad. Los primeros estudios morfológicos revelaron muertes de las células germinales tanto de manera espontánea e inducida, estos efectos fueron evidenciados después de varios tratamientos: radiación ionizante, la administración de fármacos citotóxicos, la hipertermia, la isquemia y la deficiencia de la vitamina A (Blanco-Rodríguez, 1998).

2.3. Campos electromagnéticos, radiaciones ionizantes y radiaciones no ionizantes

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a los Campos Electromagnéticos (CEM) como una combinación de ondas eléctricas y magnéticas que se desplazan

simultáneamente y se propagan a la velocidad de la luz, cuanto más elevada es su frecuencia mayor es la cantidad de energía que transporta la onda.

La mayoría de los campos electromagnéticos naturales tienen una frecuencia de 0 Hz; son campos estáticos. El concepto Electrosmog (o contaminación electromagnética) define, entonces que la contaminación por radiaciones electromagnética es causada por la moderna tecnología que afecta nuestra salud (Requejo ,1998).

Los CEM se clasifican en dos grandes grupos: Radiaciones ionizantes (con capacidad para romper los enlaces entre las moléculas) y radiaciones no ionizantes. La OMS subdivide estas últimas en: Campos electromagnéticos estáticos, no variables en el tiempo ,están presentes en los trenes de levitación magnética, sistemas de resonancia magnética para diagnóstico médico y los sistemas electrolíticos en aplicación industrial experimental. Campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja (FEB, o ELF) hasta 300 Hz presentes en los equipos relacionados con la generación, transporte o utilización de la energía eléctrica de 50 Hz (frecuencia industrial), líneas de alta y media tensión y los aparatos electrodomésticos (neveras, secadores de pelo, etc.).

En el 2007, Pillete explicó algunos elementos de la sensibilidad del hombre a los campos electromagnéticos:

1. La dimensión de las partes del cuerpo humano que actúan en la absorción de a la energía de la onda (fenómeno de bio-resonancia)
2. La sensibilidad de los campos electromagnéticos de los sistemas enzimáticos que regulan el funcionamiento del organismo humano
3. La presencia , en el cuerpo humano de cristales de magnetita
4. El fenómeno de inducción también ha de considerarse en el interior del cuerpo humano, ya que los tejidos vivos son conductores de electricidad en función de la naturaleza de los órganos.

Cuando se estudian los efectos biológicos de radiaciones electromagnéticas es importante distinguir dos rangos de radiaciones: ionizantes y no ionizantes, cuyos mecanismos de interacción con los tejidos vivos son muy diferentes.

La radiación ionizante es aquella que tiene suficiente energía para desplazar electrones de las moléculas y formar iones. Para que dicha ionización se produzca, la energía de radiación debe ser mayor que la energía que une el electrón a su molécula. Las radiaciones que componen el espectro electromagnético pueden ser ionizantes o no ionizantes. Son radiaciones ionizantes las de frecuencias más altas (longitudes de onda más cortas) ya que transportan más energía que los de las ondas de menor frecuencia (longitudes de onda más largas). Son radiaciones electromagnéticas ionizantes: los rayos gamma que emiten los materiales radioactivos, los rayos cósmicos y los rayos X (García 2009).

La OMS define a las radiaciones no ionizantes (RNI) como aquellas que poseen muy baja energía, un millón de veces menor que la necesaria para romper enlaces químicos y, por lo tanto, son incapaces de producir una ionización.

Las RNI incluyen las radiaciones ópticas (ultravioleta, visible, infrarroja y láser) y las radiaciones electromagnéticas de baja frecuencia y longitudes de onda relativamente largas (microondas, televisión, telefonía celular, radares, radiofrecuencia y muy baja frecuencias como los que producen las redes eléctricas y los campos estáticos eléctricos y magnéticos).

Las (RNI), son las ondas electromagnéticas cuyas frecuencias se extienden desde 0 Hz hasta aproximadamente 3×10^{15} Hz, frecuencia en la cual la energía del fotón iguala a 2×10^{-18} J o 12,4 eV y se hace comparable a la energía de enlace de los electrones con los átomos, por lo que antes de esa frecuencia, las ondas electromagnéticas no tienen la suficiente energía como para romper los enlaces atómicos.

Entre las RNI de las ondas electromagnéticas se incluyen, los campos estáticos (resonancia nuclear magnética), de los campos de baja frecuencia (redes de energía eléctrica, trenes, etc.), la radiofrecuencia (telecomunicaciones, diatermia quirúrgica, etc.), los campos de microondas (telecomunicaciones, radar, hornos microondas), la radiación infrarroja la luz visible, la radiación ultravioleta, etc.

La radiación electromagnética consiste de ondas de energía eléctrica y magnética moviéndose juntas a través del espacio a la velocidad de la luz. El término “campo electromagnético” (CEM) se usa para indicar la presencia de radiación electromagnética. Las diferentes formas de radiación electromagnética son clasificadas por sus frecuencias. Los CEM incluyen los campos eléctricos y magnéticos de las redes de energía (60 Hz en el Perú), la radio, la televisión, los teléfonos móviles y sus estaciones bases, radar y comunicaciones vía satélite. Muchos aparatos domésticos también transmiten CEM, tal como los teléfonos inalámbricos y los juguetes a control remoto (INICTEL-UNI, 2015).

2.4. Campos magnéticos

Los campos magnéticos se caracterizan por: la densidad de flujo magnético, usualmente designada B, y la intensidad de campo magnético usualmente designada H. La distinción entre B y H se hace importante para la descripción de los campos magnéticos en la materia, especialmente para materiales que tienen ciertas propiedades magnéticas (ferromagnéticos), tales como el hierro. Los tejidos biológicos generalmente no tienen dichas propiedades y para propósitos prácticos, B ó H pueden ser utilizados para describir los campos magnéticos afuera y dentro de los tejidos biológicos.

La unidad SI de la densidad de flujo magnético (B) es el tesla (T) y de la intensidad de campo magnético (H) es el amperio por metro ($A\ m^{-1}$). En ausencia de material magnético, $1\ \mu T = 4\pi \times 10^{-7}\ A\ m^{-1}$ Cualquiera B ó H puede ser usado para describir los campos, pero B (es decir teslas) es más común y es usado aquí. La literatura más

antigua, especialmente de Estados Unidos, frecuentemente utiliza el Gauss (G): $1\text{ T} = 10^4\text{ G}$ ($1\text{ }\mu\text{T} = 10\text{ mG}$).

2.5. Clasificación de los campos magnéticos

De acuerdo a la OMS debido a sus mecanismos de interacción con el cuerpo humano los campos electromagnéticos de radiaciones no ionizantes se pueden clasificar en:

2.5.1. Campos magnéticos estáticos: son los campos que no tienen una variación periódica con respecto al tiempo que tienen como aplicaciones principales los equipos de resonancia magnética, las líneas de energía eléctrica DC.

2.5.2 Campos magnéticos de baja frecuencia: $0\text{ Hz} < f \leq 100\text{ kHz}$ cuyas aplicaciones comprenden los trenes eléctrico, las redes de energía eléctrica, la mayoría de electrodomésticos entre otros. Que generan en el cuerpo humano corrientes inducidas.

2.5.3. Campos magnéticos de frecuencia intermedia: $100\text{ kHz} < f \leq 10\text{ MHz}$, que son los campos de la radio AM. Estos campos producen corrientes pero también pueden producir calor.

2.5.4. Campos de radiofrecuencia: $f > 10\text{ MHz}$ entre los que se encuentran aplicaciones de telecomunicaciones como la telefonía móvil, aplicaciones médicas como la diatermia quirúrgica y terapéutica, aplicaciones domesticas como los hornos microondas. Que producen calor en el material biológico.

2.6. Características de los campos magnéticos.

En el caso de las RNI, por tratarse de radiaciones no ionizantes de frecuencias muy bajas y longitudes de onda relativamente largas, poseen muy baja energía, un millón de veces menor que la necesaria para romper enlaces químicos y, por lo tanto, son incapaces de producir una ionización.

Los campos magnéticos se miden por la corriente de contacto (amperios - A), la densidad de corriente (amperios por metro cuadrado - A/m^2) la intensidad de campo eléctrico (voltios por metro - V/m), la intensidad de campo magnético (amperios por

metro - A/m) y la densidad de flujo magnético o inducción magnética (teslas –T-, militeslas –mT- o microteslas – μ T, o gauss –G- que es equivalente a 100 μ T).

Las aplicaciones que el hombre ha encontrado para las radiaciones electromagnéticas han generado numerosas fuentes, siendo la electricidad, con sus instalaciones de transmisión y de distribución y los artefactos eléctricos, la principal fuente de campos magnéticos de baja frecuencia. Las instalaciones de transmisión y distribución de electricidad y el cableado y aparatos eléctricos domésticos generan el nivel de fondo de campos magnéticos en el hogar. A ello habría que agregar fuentes de campos de otras frecuencias tales como televisor, computadora, radio portátil, horno de microondas, teléfonos celulares, etc. En el ambiente exterior el nivel de fondo está dado por la presencia de radares, sistemas antirrobo, trenes y tranvías eléctricos, antenas de radio y televisión, teléfonos celulares y estaciones base de telefonía móvil. (Repacholi, 1998).

2.7. Campos magnéticos de baja frecuencia y su efecto en la reproducción.

Los posibles efectos adversos de los CM-ELF sobre la salud reproductiva y el desarrollo han sido estudiados en modelos animales y humanos en las últimas décadas. Sin embargo, se han producido resultados contradictorios respecto a la alteración de las funciones reproductivas y de la espermatogénesis. Estudios anteriores mostraron que la exposición a CM-ELF no indujo efecto adverso sobre la espermatogénesis y la capacidad reproductiva en experimentos con humanos y animales (Ryan BM *et al.*, 1999; Lundsberg *et al.*, 1995; Kowalczyk *et al.*, 1995; Heredia Rojas *et al.*, 2004). Otros estudios mostraron un claro daño sobre la espermatogénesis (World Health Organization 2007, De Vita R *et al.*, 1995; Lee JS *et al.*, 2004). Por otra parte, De Vita *et al.* 1995 no encontraron ningún efecto sobre la distribución del contenido de ADN de diferentes tipos de células que intervienen en la espermatogénesis del hombre en ratones expuestos a 1,7 mT durante 2 h. Sin

embargo, Furuya et al. en 1998 sugiere que la exposición a largo plazo a un campo magnético ELF (1,0 Mt) tendría un posible efecto sobre la proliferación y diferenciación de las espermatogonias.

2.8. Lectinas de Dolichos Biflorus Aglutinina (DBA).

Las lectinas son un grupo de proteínas de origen no-inmune que comparten la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a los carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas (Brownel AG 1977, Wartiovaara J et al., 1978)

Dolichos biflorus agglutinin es una glicoproteína con peso molecular alrededor de 111 kDa y está formado de 4 subunidades de aproximadamente igual tamaño. Esta lectina tiene un carbohidrato específico a α -linked N-acetilgalactosamina.

Estas proteínas usualmente tienen al menos dos sitios de unión por molécula: un azúcar específico y una molécula glicosilada, frecuentemente son usadas para la identificación, caracterización y aislamiento de subpoblaciones de células nuevas en base en la presentación de grupos de carbohidratos en su superficie celular, muchas de ellas son utilizadas en la identificación de células madre adultas neurales, también en el fraccionamiento de las células madre hematopoyética en murinos. Las lectinas han sido también utilizadas para identificar los glicoepítomos en la superficie de las células de carcinoma embrionario y las células embrionarias durante el desarrollo de preimplantación de los vertebrados (Nash et al., 2006., Wu TC et al., 1983, Rietze RL et al., 2001).

III HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

3.1 Hipótesis

- Las ondas electromagnéticas de frecuencia extremadamente baja, afectan negativamente la calidad de las células madre espermatozonales.

3.2 Objetivo general:

- Evaluar el efecto de la exposición crónica *in vivo* de campos magnéticos de baja frecuencia en las células germinales de ratón.

3.3 Objetivos específicos:

- Realizar un protocolo de aislamiento de células madre espermatozonales.
- Evaluar efecto de los campos magnéticos de baja frecuencia mediante la expresión y afinidad al FITC-DBA en edad temprana y edad adulta.
- Evaluar el efecto de los campos magnéticos en la diferenciación *in vivo* en los ratones en edad temprana.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. 1. Material de Laboratorio.

a. Reactivos:

- Medio DMEM (SIGMA).
- Colagenasa (SIGMA).
- Hialuronidasa (SIGMA).
- ADNasa (SIGMA).
- Suero Bovino Fetal (GIBCO).
- DBA-FITC (SIGMA).
- Buffer Fosfato Salino PBS 1X.

- Metanol 80°.
- Azul de tripán.
- Estreptomicina.
- Penicilina.
- Gentamicina.
- BSA.
- Eosina Y.

b. Materiales de plástico y vidrio.

- Tips de 10µL, 100µL, 1000µL.
- Pipeta de 1mL.
- Placas Petri de 6 pocillos.
- Filtro de 40µm.
- Guantes.
- Láminas y laminillas.

c. Materiales del Bioterio

- Viruta
- Materiales de limpieza

d. Equipos.

- **Laboratorio de Fisiología de la Reproducción (LFRA).**
 - Rotador de tubos.
 - Microscopio invertido.
 - Microscopio de luz.
 - Incubadora con CO₂.
 - Centrifuga.
 - Cámara de flujo laminar.

- **Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular (LICM) de la empresa FARVET**

- Citómetro de flujo Gallios
- Centrifuga
- Incubadora
- Micropipetas
- Cámara de flujo laminar

4.1.2. Material biológico:

Durante el desarrollo del proyecto se usaron 20 ratones macho de la cepa BalbC: 10 ratones 14dpp, 30 ratones 73-77dpp, los cuales fueron mantenidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones fisiológicas: a una temperatura de 25 a 27°C, con libre acceso a la comida balanceada (Purina-Perú), agua: *ad libitum* y un fotoperiodo de 14/10 horas luz/oscuridad.

4.2 .Metodología.

4.2.1 Sistema generador de campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja para exposición In vivo (CEM-ELF).

Para el siguiente experimento se contó con sistemas generadores de campos electromagnéticos los que fueron acondicionados a 715 Mt. Los que fueron basados en bobinas de Helmholtz. Los campos generados están de acuerdo a los límites de exposición recomendados por la Comisión Internacional de Protección contra las Radiaciones No Ionizantes (ICNIRP). Se evaluó el efecto de la exposición de los campos electromagnéticos en las células germinales de ratones machos, los cuales fueron instalados en jaulas no metálicas equipadas con bebederos no metálicos.

La medición de la intensidad del campo magnético se realizó mediante un analizador de campos electromagnéticos de baja frecuencia provisto de una sonda isotrópica

para campo magnético. Al inicio se midió en 20 puntos dentro y fuera de la bobina de Helmholtz de tal manera de caracterizar el campo magnético. Estos trabajos fueron realizados por la Facultad de Ingeniería Electrónica y Eléctrica de la UNMSM.

4.2.2 Sistemas de exposición a campos magnéticos basados en bobinas de Helmholtz.

Los sistemas de exposición más simples fueron habilitados por las bobinas de Helmholtz acondicionados con soportes adecuados al tamaño de las jaulas para los ratones (ver Fig. N° 2).



Fig. N° 2. Sistemas de exposición a campos magnéticos basados en bobinas de Helmholtz.

4.2.3. Diseño del sistema de exposición a campos magnéticos.

El diseño se basó en el modelo Código correspondiente al proyecto Multidisciplinario con Código N° PMI2013J03, propuesto por el Ing. Víctor Cruz. Los cálculos para el diseño del sistema de exposición se realizaron mediante el software Matlab.

El sistema de exposición está basado en un conjunto de 04 bobinas de Helmholtz y para la implementación de las mismas se utilizó cable AWG N°18 de 0.00102m de diámetro, considerando un radio de la bobina de 0.36m y 80 vueltas por cada carrete, con una separación entre carretes de 0.36m y para la alimentación del voltaje se utilizaron transformadores con 04 tomas cuyas salidas fueron 4.5 V y 45 V .

4.2.4 Exposición a campos magnéticos.

Los ratones se sometieron a dosis continuas de exposición a CEM-ELF de 715,5 μ T, 50-60 Hz a través de bobinas de inducción, durante 10 días a los dos grupos en estudio. Se consideraron 5 animales en cada grupo de evaluación.

4.2.5. Procedimiento experimental.

El trabajo se realizó con un total de 30 ratones divididos en 6 grupos:

Grupos de edad temprana:

- **GRUPO I:** Ratones de 14 dpp sin exposición a campos magnéticos .
- **GRUPO II:** Ratones de 14 dpp: A los 4dpp fueron expuestos a campos magnéticos de 50-60 Hz, 715 uT durante 10 días.

Grupos de diferenciación *in vivo*:

- **GRUPO III:** Ratones de 73ddp. sin exposición a campos magnéticos.
- **GRUPO IV:** Ratones de 73dpp: A los 4 dpp fueron expuestos a campos magnéticos a 50-60 Hz ,715 uT durante 10 días y evaluados a los 73 dpp.

Grupos de edad adulta.

- **GRUPO V:** Ratones de 10-11 semanas (70-77dpp) sin exposición a campos magnéticos.
- **GRUPO VI:** Ratones de 10-11 semanas: Ratones de 5-6 (70-77dpp) semanas expuestos a campos magnéticos a 50-60 Hz ,715 uT durante 35 días.

A continuación se muestra la metodología y los grupos en estudio (**Fig. 3**).

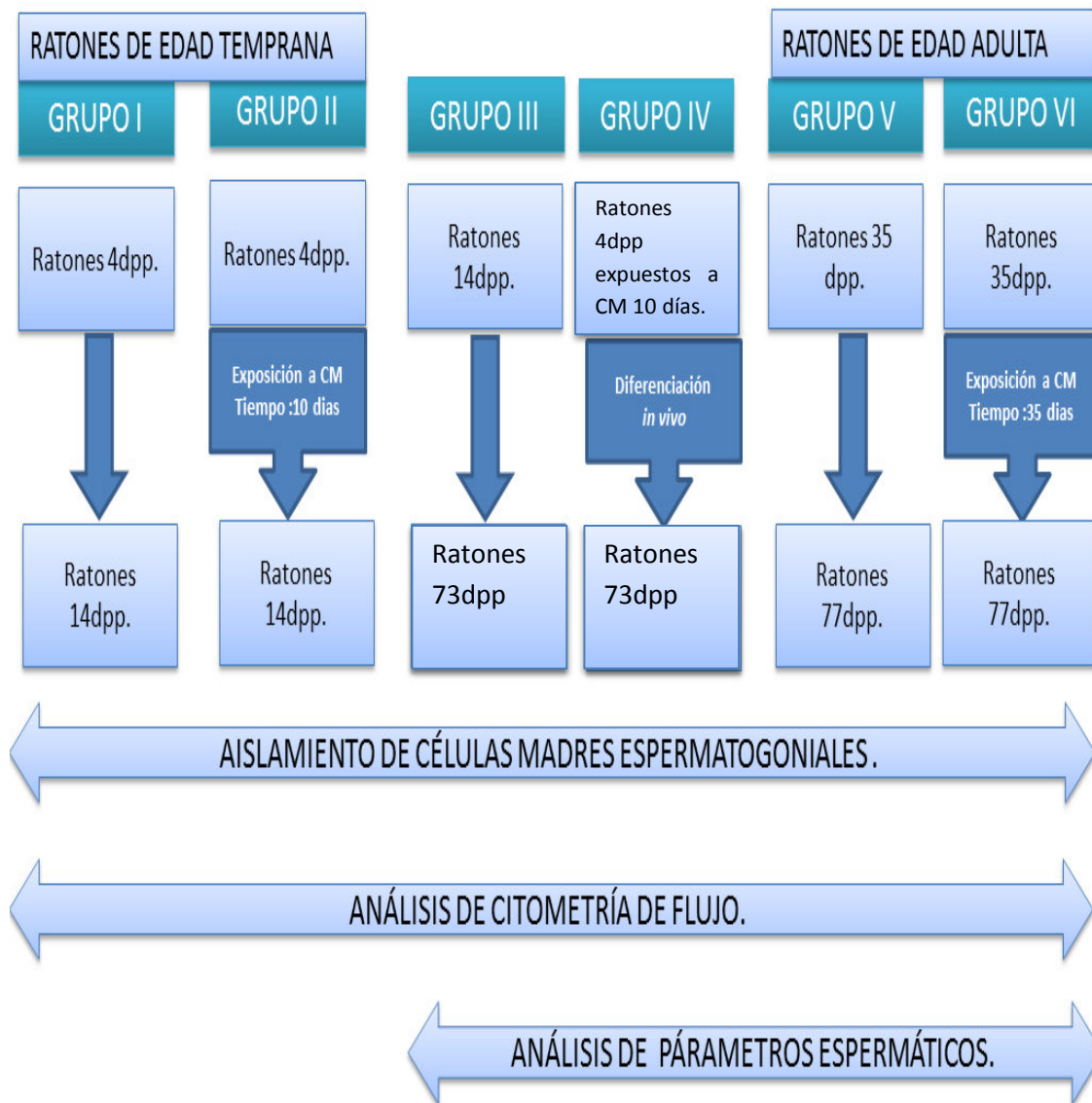


Fig Nº. 3. Flujograma de los grupos de estudio y metodología seguida.

4.2.5.1. Aislamiento de Células madre espermátogoniales (SSC)

El aislamiento de células madre espermátogoniales, se basó en el protocolo descrito por Schrans-Stassen et al. 1999.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se ubicaron los testículos y estos fueron aislados en placas petris estériles.

Los testículos fueron decapsulados, y sometidos a dos sucesivos tratamientos enzimáticos (1 mg de cada enzima ml^{-1} en medio MEM durante 30 min y 20 min, respectivamente): el primer tratamiento se realizó con hialuronidasa, colagenasa y DNAasa; la digestión se realizó a 37 °C, durante la incubación los tubos fueron colocados en rotador de tubos, lo que permitió que la solución siempre esté en contacto con la muestra, evitando la sedimentación durante el tiempo de incubación; luego las células fueron lavadas 2 veces con medio MEM a 3500 rpm; el segundo tratamiento fue solo con hialuronidasa y colagenasa luego las células fueron lavadas dos veces a 3500 rpm (Fig.4).

Luego del aislamiento, las células madres espermátogoniales fueron mantenidas a 37°C, se procedió a realizar la concentración, viabilidad y fijación para su posterior análisis.

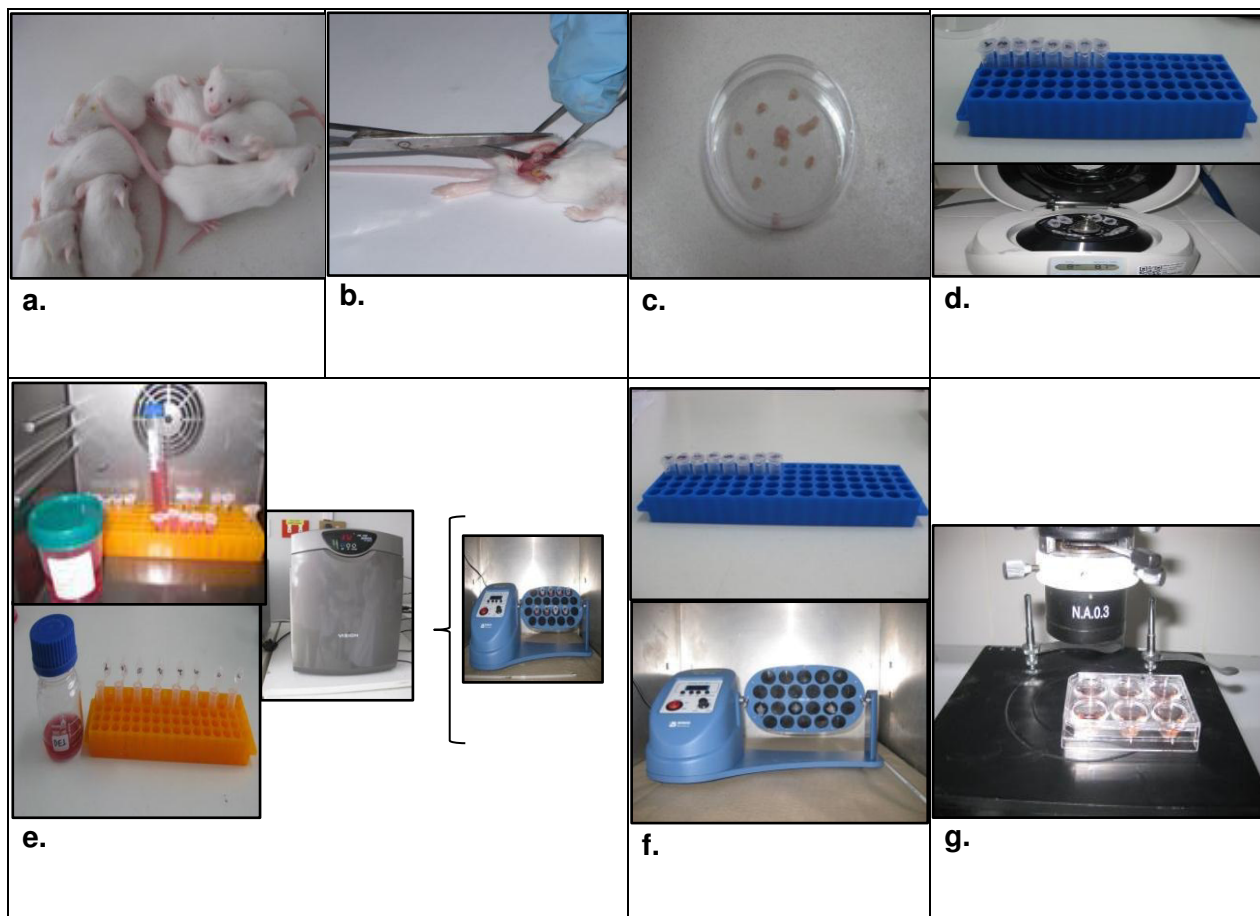


Fig. Nº 4. Metodología del aislamiento de células madre espermatogoniales de ratón. a. Ratones de 14 dpp. b. Disección de los testículos. c. Aislamiento de los testículos. d. Lavado de las muestras de los testículos. e. Primera digestión enzimática. Incubación de las muestras a 37°C. f. Segunda digestión enzimática. Incubación de las muestras a 37°C. g. Observación de las muestras al microscopio invertido.

4.2.5.2 Concentración de células madres espermatogoniales.

La concentración de células madres se determinó usando el método del hemocitómetro, para lo cual se usó la cámara Neubauer, la cual contiene 2 cuadrados grandes, cada uno dividido en 16 cuadrados pequeños.

Para realizar el conteo, se realizó una dilución de 10 µl de muestra en 990 µl de agua destilada luego se colocó 10 µl de esta dilución en el centro de la cámara, se dejó reposar 5 minutos y se realizó el conteo de los 25 cuadrados. El resultado final del conteo se expresó en millones de células madre espermatogoniales por mililitro.

4.2.5.3. Viabilidad de células madres espermatogoniales.

El resultado fue expresado en porcentaje de espermatozoides vivos. Se utilizó el colorante azul de Tripán 0.4% para evaluar la vitalidad de los espermatozoides y encontrar la proporción de células madre vivas y muertas. Sobre un portaobjeto previamente a temperado a 37°C se colocarán 10 ul de la muestra espermática y luego se añadirán 10 ul de azul de tripán (temperada a 37°C), se mezclaron ambas gotas y se dejó la muestra incubando por 2 minutos. Se colocó en un cubreobjeto y se observó bajo el microscopio de luz a 400X de magnificación. Los criterios para evaluar las células madre espermatogoniales fueron:

- 1- Células madre espermatogoniales muertas: células de color azul.
- 2- Células madre espermatogoniales vivas: células de color blanco.

4.2.5.4 Fijación de las células madre espermatogoniales.

Luego del aislamiento de las células, estas fueron centrifugadas durante 10 min a 2500 rpm y lavadas con 500 ul de PBS1X, después se agregó 800 ul de metanol al 80% y fueron fijadas durante 15 minutos a -20 °C ,después se realizaron 2 lavados con 500u L de PBS1X a 1500rpm.

4.2.5.5. Citometría de flujo.

Para la citometría de flujo ,se realizaron dos lavados y se ajustaron las células a 10⁶ células/ml ,se adicionaron 5 u L del flourocromo conjugado FITC-DBA y se incubo a

37°C por 15min, luego se agregó 2ml de PBS 1X a cada tubo y se centrifugo a 10min x300g, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 500 ul de PBS1X para luego ser leído por el citómetro de flujo Gallios, en el Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular (LICM) de la empresa FARVET. Para el análisis de los datos de citometría de flujo se utilizó el uso del software Kaluza 3.0.

4.2.5.6. Parámetros espermáticos.

En los ratones de los grupos III, IV, V y VI, se aisló los epidídimos y se realizó el análisis de los parámetros espermáticos.

4.2.5.7. Movilidad espermática:

La movilidad espermática fue evaluada de acuerdo al criterio del Organismo Mundial de la Salud (OMS, 2010).

Se tomó 10 ul de la muestra espermática, se colocó sobre un portaobjetos previamente atemperado a 37°C y se observó al microscopio de campo claro a una magnificación de 400X. La motilidad de cada espermatozoide encontrado fue clasificado de la siguiente forma:

P: motilidad progresiva

NP: motilidad no progresiva

I: Inmóvil.

Se evaluaron varios campos microscópicos hasta obtener un total de 100 espermatozoides, de los cuales se tomaron en cuenta la motilidad progresiva (P). Los valores fueron expresados en porcentajes, en base a 100 espermatozoides del campo observado.

4.2.5.8 Concentración espermática.

La concentración de espermatozoides fue evaluada de acuerdo criterio del Organismo Mundial de la Salud (OMS,2010),se determinó usando el método del hemocitómetro, para lo cual usamos la cámara Neubauer, la cual contiene 2 cuadrados grandes, cada uno dividido en 16 cuadrados pequeños.

Para realizar el conteo, se realizó una dilución de 10 µl de muestra en 990 µl de agua destilada luego se colocará 10 µl de esta dilución en el centro de la cámara, se dejó reposar 5 minutos y se realizó el conteo de los 25 cuadrados. El resultado final del conteo se expresó en millones de espermatozoides por mililitro.

4.5.2.9. Vitalidad espermática.

Se realizó mediante el uso del colorante vital Eosina Y al 0.5% para evaluar la vitalidad de los espermatozoides y encontrar la proporción de espermatozoides vivos y muertos. Sobre un portaobjeto previamente atemperado a 37°C se colocó 5 µl de la muestra espermática y luego se añadió 5 µl de eosina Y (atemperada a 37°C), se mezclaron ambas gotas y se dejó la muestra incubando por 2 minutos. Se colocó en un cubreobjeto y se observó bajo el microscopio de luz a 400X de magnificación. Los criterios para evaluar los espermatozoides fueron:

- 1- Espermatozoides muertos: cabeza rosada.
- 2- Espermatozoides vivos: cabeza blanca.

4.5.2.10. Integridad de membrana plasmática (Test de HOST).

El resultado fue expresado en porcentaje de espermatozoides con membrana intacta, es decir el porcentaje de espermatozoides que responden al test Hiposmótico.

La evaluación será mediante el test hiposmótico, también conocido como test HOST, se preparó una solución hipoosmótica con una osmolaridad final de 100 mOsm. 30 µl de la preparación de espermatozoides serán transferidos a 270 µl de la solución hipoosmótica (1:10, v/v) por 30 minutos a 37°C. Se evaluó la proporción de espermatozoides mostrando el típico enrollamiento de la cola (causado por el hinchamiento) con respecto del número total de espermatozoides evaluados.

V. RESULTADOS.

V.I Aislamiento de células madres espermatozonales.

Los diferentes tipos de células obtenidas luego de las digestiones fueron: células madre espermatozonales de tipo A: pequeñas, grandes, células aglutinadas y células somáticas (Fig. Nº 5).

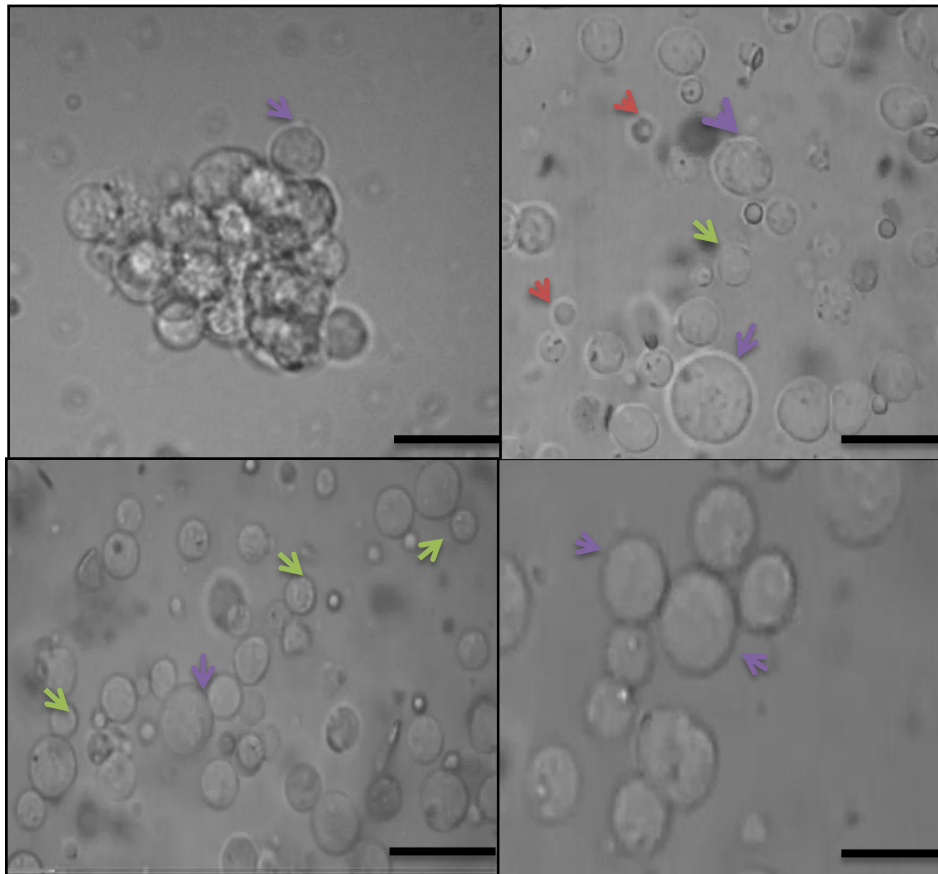


Fig. Nº 5. Células madre espermatozonales de tipo A en varias etapas (a –e). (a) Se observa la presencia de aglutinación de células (clumps), acompañadas de células espermatozonales de tipo A (flechas moradas). (b-e) Células madres espermatozonales grandes (flecha morada) y pequeñas (flecha verde) y células somáticas (flecha roja) .Barra de escala representa (b-d) 22,0 μ m y (e) 5 μ m.

5.2 Resultados de concentración y viabilidad de las células madre espermatozonales de ratón.

✓ 14dpp

A los 14 dpp se observó que los ratones sin exposición a campos magnéticos, grupo I, presentó una concentración de $(25,62 \pm 2,51)$ células $\times 10^6/\text{ml}$ y una viabilidad de $(59,00 \pm 8,94)$ %, el grupo II, ratones sin exposición a campos magnéticos presentó una disminución significativa ($P < 0.05$) en los valores de concentración y viabilidad $(12,15 \pm 3,55)$ células $\times 10^6/\text{ml}$ y $(42,00 \pm 7,58)$ % respectivamente (Fig. 6).

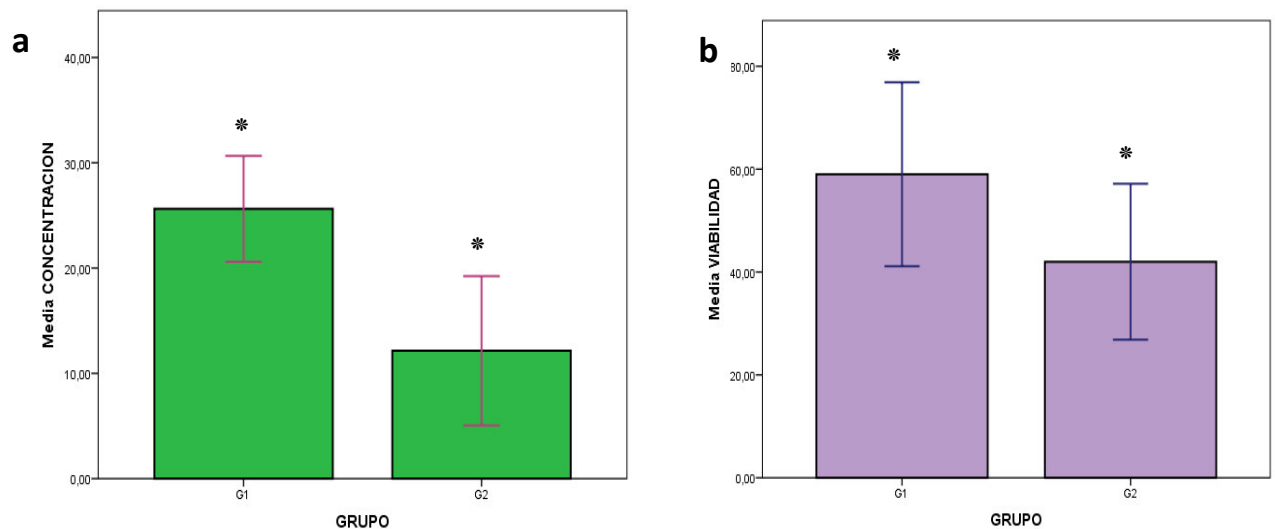


Fig. N°6. Gráficas de las medias de la concentración y vitalidad de los grupos 1 y 2. Las barras de error indican la desviación estándar. **(a)** Gráfica de la media de la concentración de las células madre espermatozonales **(b)** Gráfica de la media de la vitalidad de células madre espermatozonales. (*)Indica diferencias significativas.

✓ **A los 53 dpp: Diferenciación *in vivo*.**

Luego de 53 días los ratones del grupo III, expuestos durante 10 días, presentaron una concentración en promedio de $(14,50 \pm 9,09)$ células $\times 10^6/\text{ml}$ y una viabilidad de $(73,20 \pm 10,71) \%$, lo que representó una disminución significativa ($P < 0.05$) en los valores de concentración y viabilidad respecto a los valores del grupo I de $(26,62 \pm 2,51)$ células $\times 10^6/\text{ml}$ y $(59,00 \pm 8,94) \%$ respectivamente (Fig. 7).

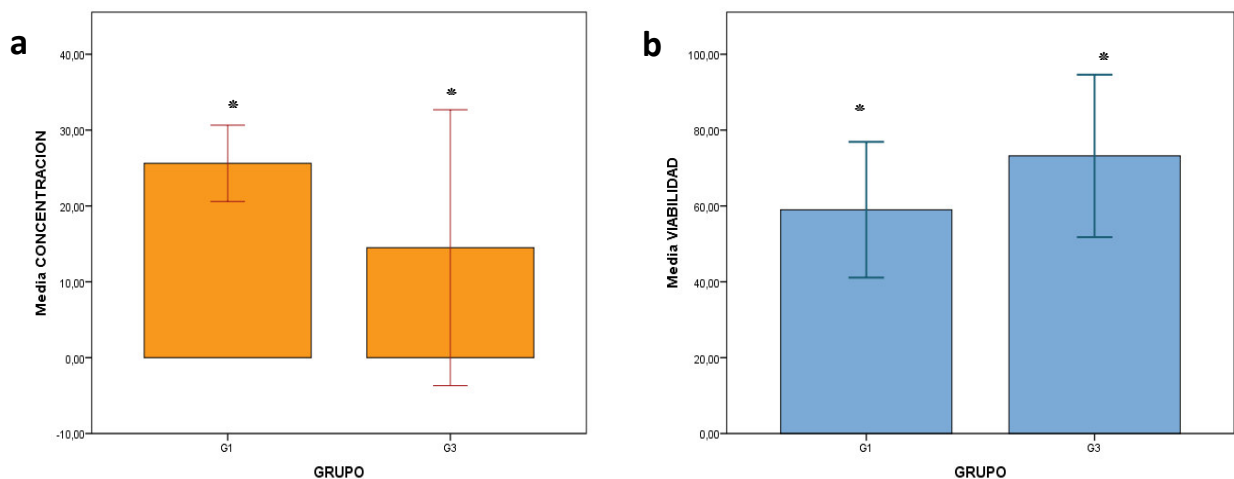


Fig. N°7. Gráficas de las medias de la concentración y vitalidad de los grupos 1 y 3. Las barras de error indican la desviación estándar. **(a)** Gráfica de la media de la concentración de las células madre espermatogoniales **(b)** Gráfica de la media de la vitalidad de células madre espermatogoniales. (*)Indica diferencias significativas.

En el grupo IV, la concentración en promedio fue de $(18,00 \pm 7,74)$ células $\times 10^6$ / ml y una viabilidad de $(76,00 \pm 8,46)$ %, no se presentó diferencias significativas ($P > 0.05$) respecto al grupo I (**Fig.Nº8**).

✓ **A los 77 dpp: Exposición crónica.**

A los 77 dpp, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los grupos V y VI, el grupo VI expuesto a campos magnéticos presento una concentración y una viabilidad de $(13 \pm 5,6)$ células $\times 10^6$ / ml y $(56 \pm 11,40)$ % respectivamente (**Fig. Nº9**).

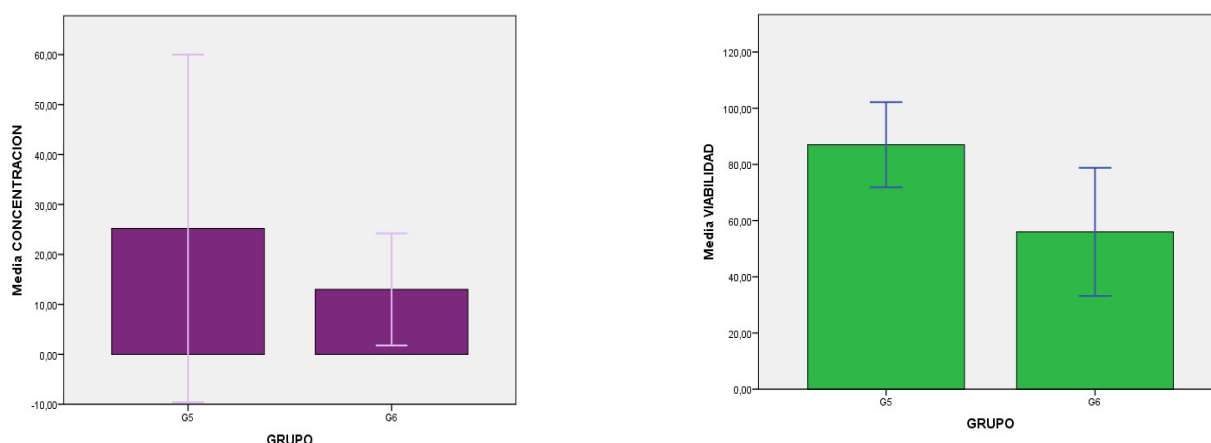


Fig. Nº8. Gráficas de las medias de la concentración y vitalidad de los grupos 5 y 6. Las barras de error indican la desviación estándar. **(a)** Gráfica de la media de la concentración de las células madre espermatozonales **(b)** Gráfica de la media de la vitalidad de células madre espermatozonales. (*)Indica diferencias significativas.

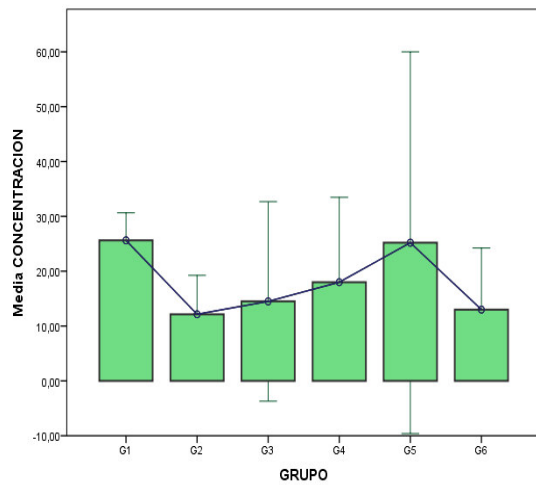
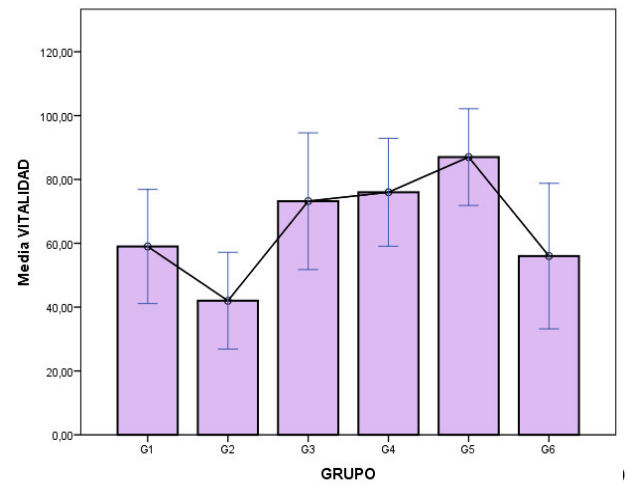
a**b**

Fig. N°9. Gráficas de las medias de la concentración y vitalidad de los grupos 1, 2, 3, 4,5 y 6.

Las barras de error indican la desviación estándar. (a) Grafica de la media de la concentración de las células madre espermatogoniales (b) Grafica de la media de la vitalidad de células madre espermatogoniales .

5.3. Resultados de la concentración, viabilidad, integridad de la membrana y movilidad de los espermatozoides epididimarios.

5.3.1 Concentración de espermatozoides.

✓ Diferenciación *in vivo*.

El grupo de diferenciación *in vivo*, grupo III presento una concentración de $(26,60 \pm 8,50 \text{ células } \times 10^6 / \text{ ml})$, y el grupo IV $(44,40 \pm 24,99 \text{ células } \times 10^6 / \text{ ml})$ no se observaron diferencias significativas en los valores de la concentración espermática ($p < 0,05$).

✓ Exposición crónica

Entre los grupos de estudios correspondientes a los grupos de exposición crónica: grupo V $(74,80 \pm 30,64 \text{ células } \times 10^6 / \text{ ml})$ y grupo VI $(151 \pm 73,43 \text{ células } \times 10^6 / \text{ ml})$, no se observaron diferencias significativas en los valores de concentración ($p < 0,05$).

Las medias de los resultados de la concentración espermática se muestran en la figura N°10.

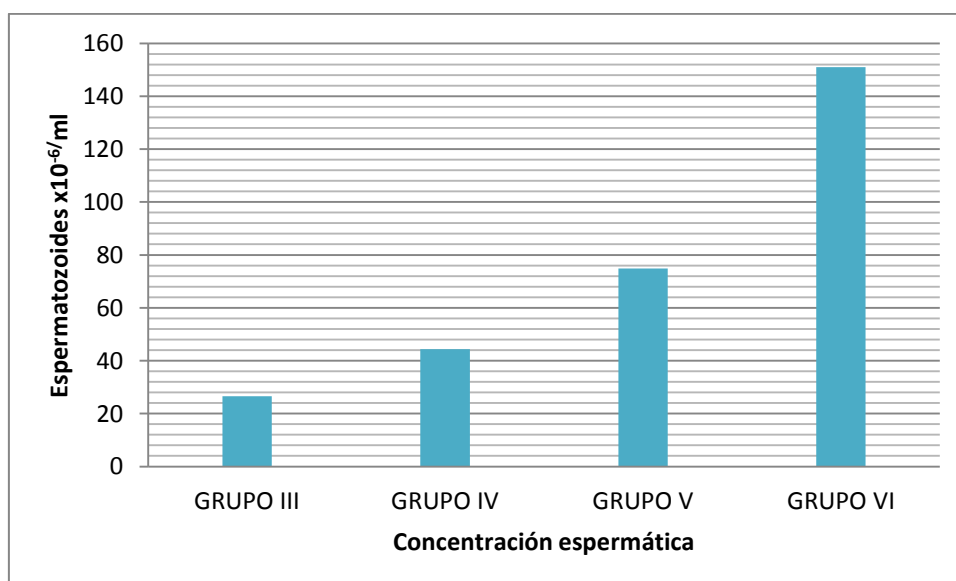


Fig. N°10 .Gráfica de las medias de la concentración de los grupos III, IV, V, VI.

5.3.2 Viabilidad de espermatozoides.

✓ Diferenciación *in vivo*.

Entre los grupos de estudios correspondientes a los grupos de diferenciación *in vivo*: III ($96,80 \pm 3,27$) %, IV ($80,60 \pm 15,7$) % no se observaron diferencias significativas en los valores de la viabilidad espermática ($p > 0,05$).

✓ Exposición crónica

Entre los grupos de estudios correspondientes a los grupos de exposición crónica: V ($74 \pm 8,21$) % y VI ($79 \pm 12,45$) % , no se observaron diferencias significativas en los valores de la viabilidad espermática ($p > 0,05$).

Las medias de los resultados de la viabilidad espermática se muestran en la figura N°11.

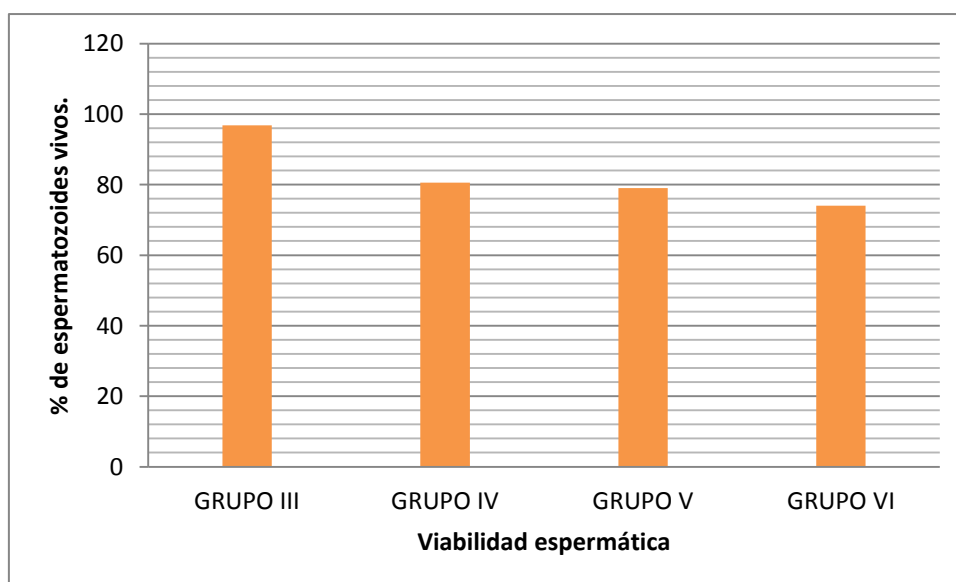


Fig. N°11. Gráfica de las medias de la viabilidad de los grupos III, IV, V, VI.

5.3.3 Integridad de membrana (HOST) de espermatozoides.

✓ Diferenciación *in vivo*.

Entre los grupos de estudios correspondientes a los grupos de diferenciación *in vivo* y los de edad adulta: III ($67,20 \pm 5,02$ %), IV ($64,4 \pm 9,53$ %) no se observaron diferencias significativas en los valores de la integridad de membrana ($p > 0,05$).

✓ Exposición crónica

Entre los grupos de estudios correspondientes a los grupos de exposición crónica: V ($85 \pm 6,13$ %) y VI ($82 \pm 9,09$ %) , no se observaron diferencias significativas en los valores de la integridad de membrana ($p > 0,05$).

Las medias de los resultados de la integridad de membrana se muestran en la figura N°12.

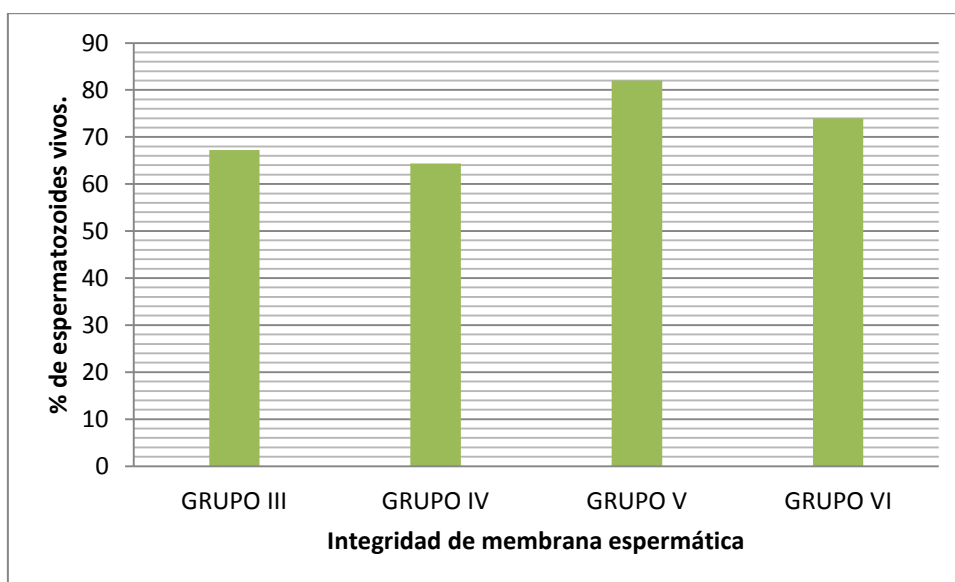


Fig. N°12 .Gráfica de las medias de la integridad de membrana de los grupos III, IV, V, VI.

5.3.4 Movilidad de espermática.

✓ Diferenciación *in vivo*.

La movilidad espermática si se vio afectada por los campos magnéticos, en los grupos de diferenciación *in vivo*, el grupo III, que fue expuesto a campos magnéticos presento una disminución significativa ($p>0,05$) en la movilidad presentando un valor de $(62,40\pm6,54)$ %, respecto al grupo IV que obtuvo una movilidad del $(27,60\pm 3,85)$ %.

✓ Exposición crónica

Entre los grupos de estudios correspondientes a los grupos de exposición crónica: V $(84\pm 6,52)$ % y VI $(82\pm 14,27)$ % no se observaron diferencias significativas en los valores de la movilidad espermática ($p>0,05$).

Las medias de los resultados de la movilidad espermática se muestran en la figura N°13.

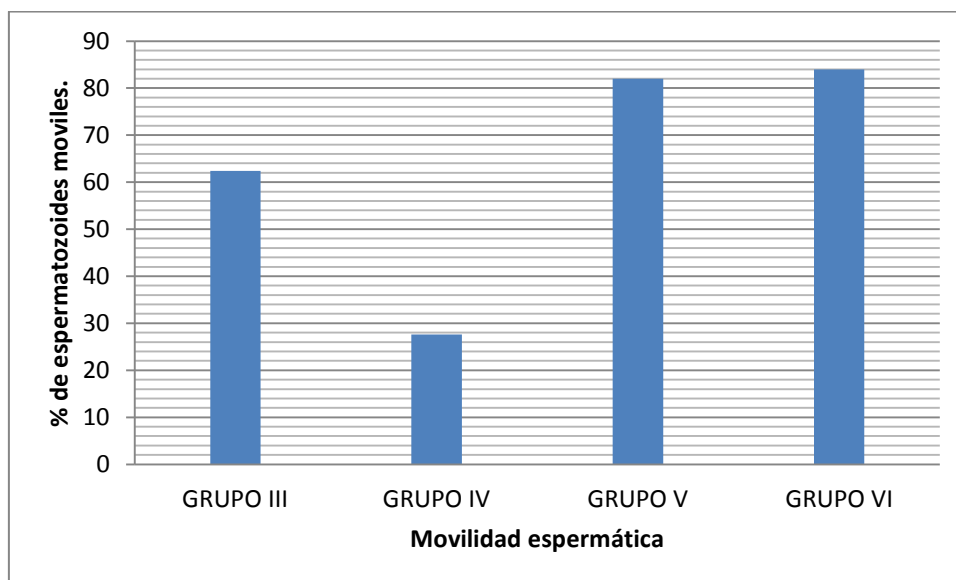


Fig. N°13 .Gráfica de las medias de la movilidad espermática de los grupos III, IV, V, VI.

5.4 Resultados de la citometría de flujo.

5.4.1 .Resultados de la citometría de flujo de los grupos de edad temprana (14dp): I y II.

En los resultados de la citometría de flujo de los 2 grupos de temprana edad se observaron las distribuciones de la fluorescencia de Dolichos biflorus aglutinina (DBA) después de la tinción con DBA–fluoresceína isotiosanato (DBA-FITC). La representación gráfica de puntos muestran las subpoblaciones A y B de células marcadas con DBA-FITC en función de dos factores: tamaño y de la intensidad de fluorescencia (Fig.Nº 14 y 15).

Los células madre espermatogoniales del grupo I (C1 y C2), presentaron los mayores valores de afinidad al DBA y la siguientes conformaciones de subpoblaciones: 74,25% (A: 24,05%, B 75,95%): y 65,56%(A: 29,85%, B 70,15%) respectivamente.

Los ratones expuestos a campos magnéticos, grupo II (E1,E2,E3 y E4),experimentaron una menor cantidad de células positivas al DBA 60,68% (A:39,65%, B:60,35%) ,59,49% (A:34,33%,B:65,67%) ,57,64% (A:51,8%,B:48,02%),59,52% (A:39,8%,B:60,02) respectivamente.

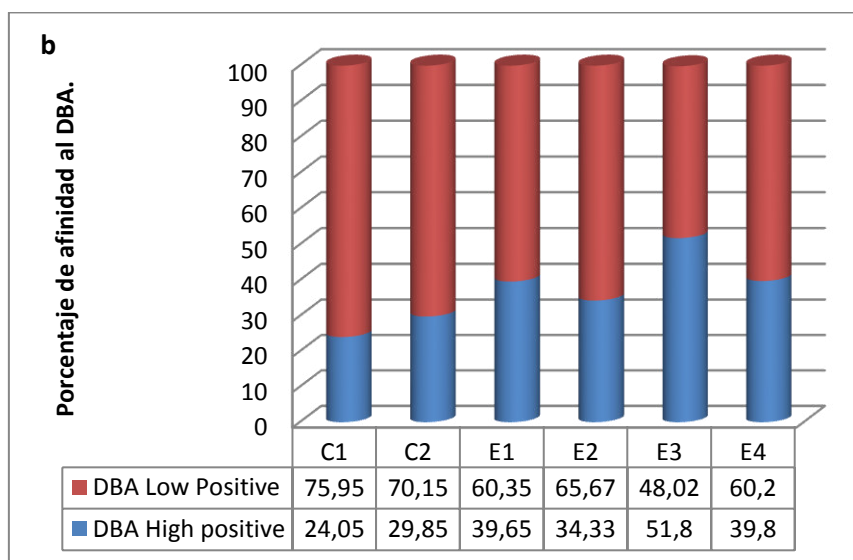
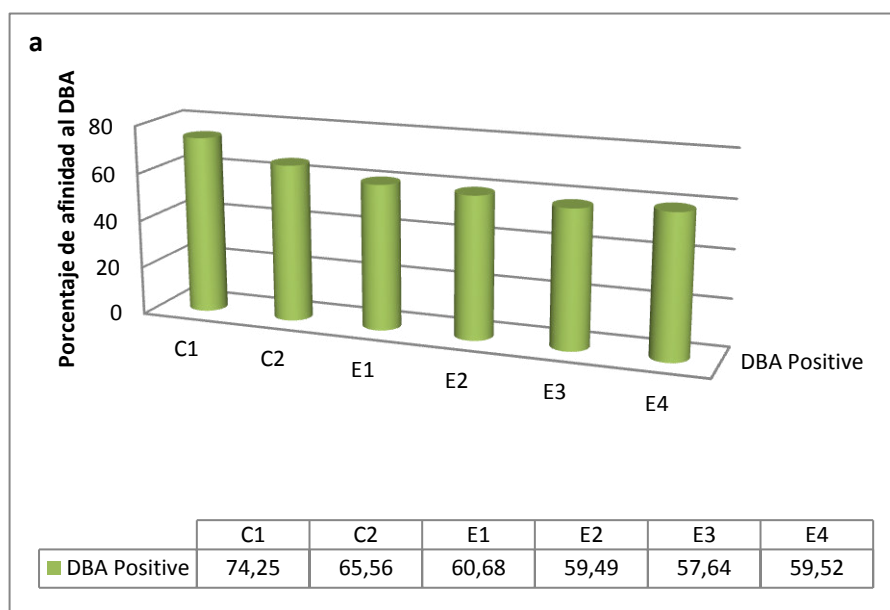


Fig. N° .14. Porcentaje de células madres espermatogoniales positivas al DBA.(a)Porcentaje de células positivas al DBA.(b)Subpoblaciones A y B . Porcentaje de las subpoblaciones Alta afinidad (barra roja) y baja afinidad (barra azul).

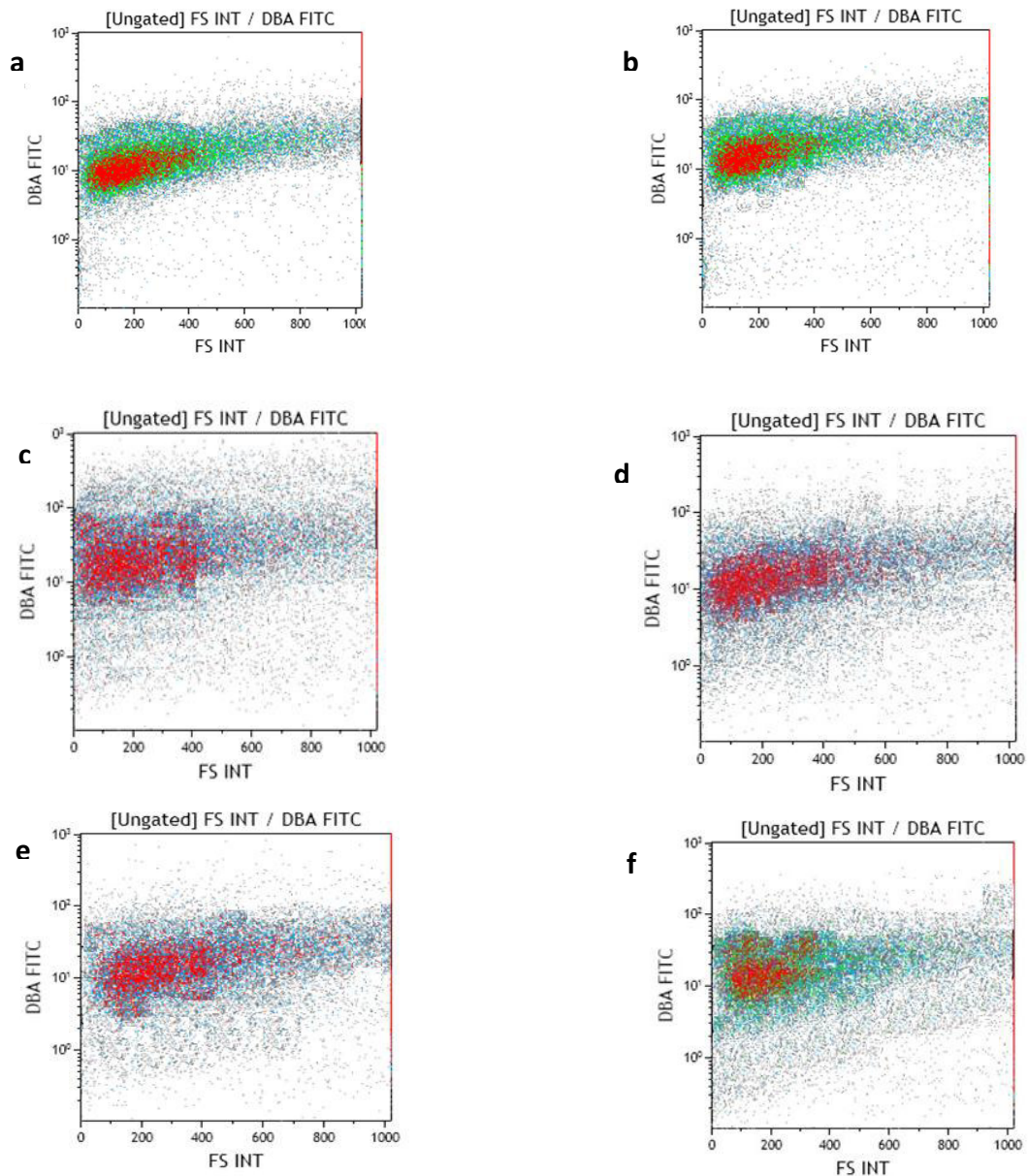


Fig. N° 15. (a, b, c y d). Distribución de la fluorescencia de Dolichos biflorus aglutinina (DBA) después de la tinción con DBA–fluoresceína isotiosanato (DBA-FITC). Representación gráfica de puntos que muestran las subpoblaciones A (rojo) y fB (azul) de células marcadas con DBA-FITC en función de su tamaño o de la intensidad de fluorescencia. El eje X representa el tamaño de la célula medida por dispersión frontal, en contra de la dispersión lateral (SSC) representada en el eje Y; (b) la fluorescencia se mide por dispersión frontal (FSC) frente a FITC. (a y b) representan individuos del grupo I y (c, d y e), individuos del grupo II.

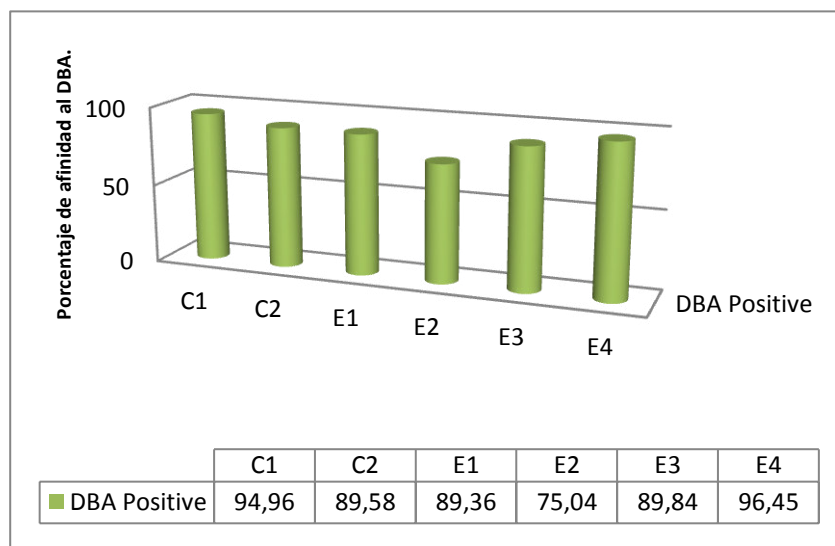
5.4.2 .Resultados de la citometría de flujo de los grupos de recuperación *in vivo*: grupos III y IV.

El análisis de la citometría de los individuos de los grupos III y IV, evidenció que no existieron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de células positivas al DBA.

Luego de la diferenciación *in vivo*, el grupo IV, no presentó diferencias significativas, en cuanto a la conformación de subpoblaciones A y B (Fig. N°16).

La representación gráfica de puntos muestran las subpoblaciones A y B de células marcadas con DBA-FITC en función de dos factores: tamaño y de la intensidad de fluorescencia, esta subpoblaciones están más marcadas en su delimitación (Fig.N°17)

a



b

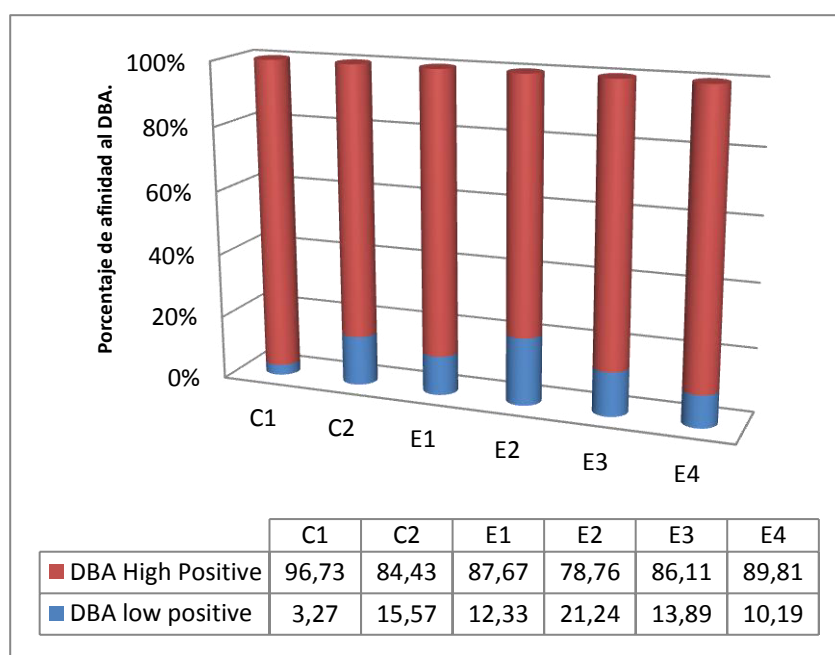


Fig. Nº 16 Porcentaje de células madres espermatogoniales positivas al DBA (a) .Porcentaje de células positivas al DBA.(b)Subpoblaciones A y B . Porcentaje de las subpoblaciones con alta afinidad (barra roja) y baja afinidad (barra azul).

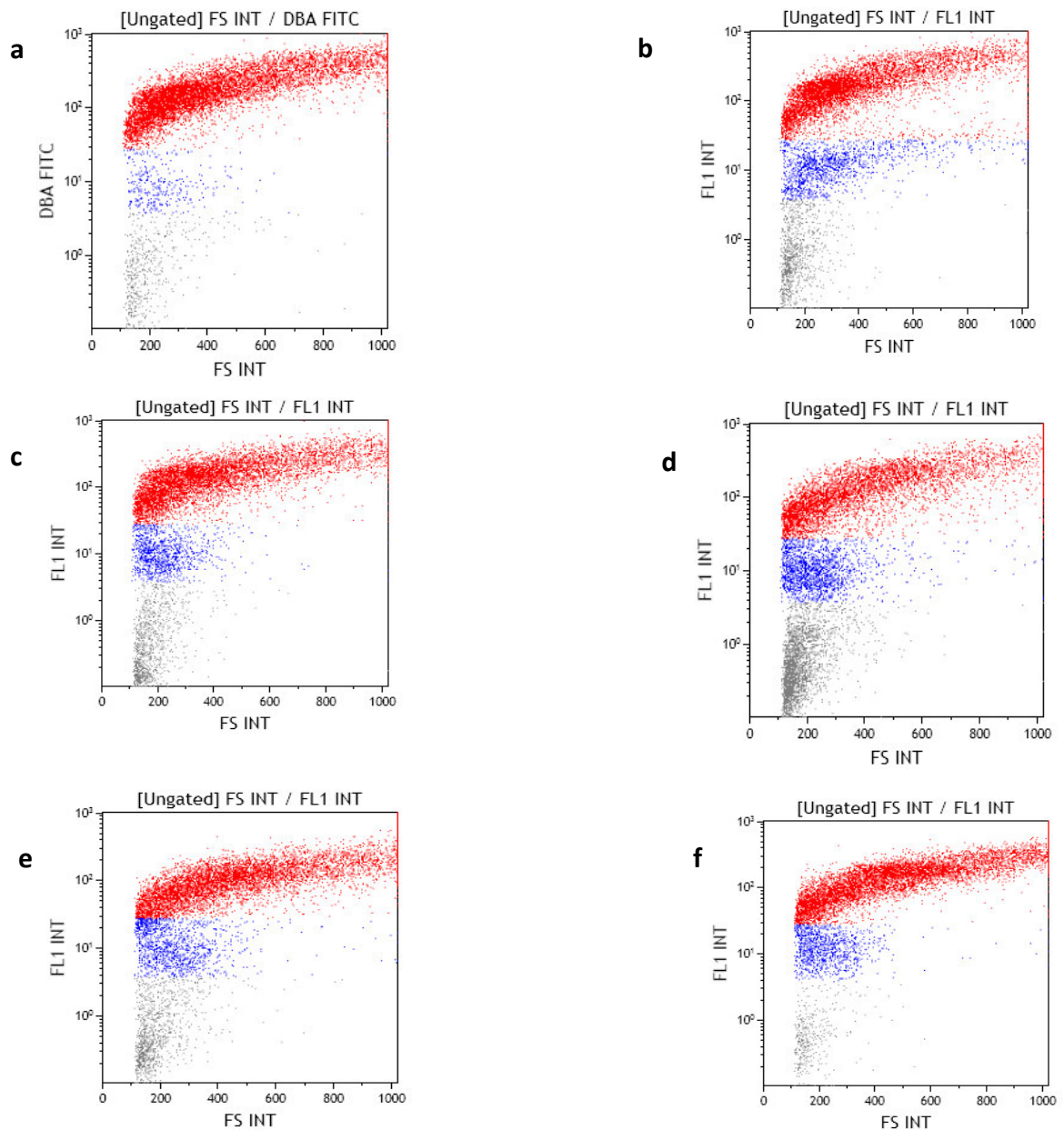


Fig. N° 17. (a, b, c y d). Distribución de la fluorescencia de Dolichos biflorus aglutinina (DBA) después de la tinción con DBA–fluoresceína isotiosanato (DBA-FITC). Representación gráfica de puntos que muestran las subpoblaciones A(color rojo) y B(color azul) de células marcadas con DBA-FITC en función de su tamaño o de la intensidad de fluorescencia. El eje X representa el tamaño de la célula medida por dispersión frontal, en contra de la dispersión lateral (SSC) representada en el eje Y; (b) la fluorescencia se mide por dispersión frontal (FSC) frente a FITC. (a y b) representan individuos del grupo III y (c,d ,e y f),individuos del grupo IV.

5.4.3. Resultados de la citometría de flujo de los grupos V y VI.

Los resultados individuales indicaron que luego de una exposición de ratones adultos del grupo I expuestos a campos magnéticos durante 35 días, la cantidad de células positivas fue del 80 % (A: 95,7%, B: 4,3%) y el grupo VI, sin exposición a campos presentó el 75,6 % (A: 84, 6%, B: 15,4%) de células positivas (Fig. N° 18).

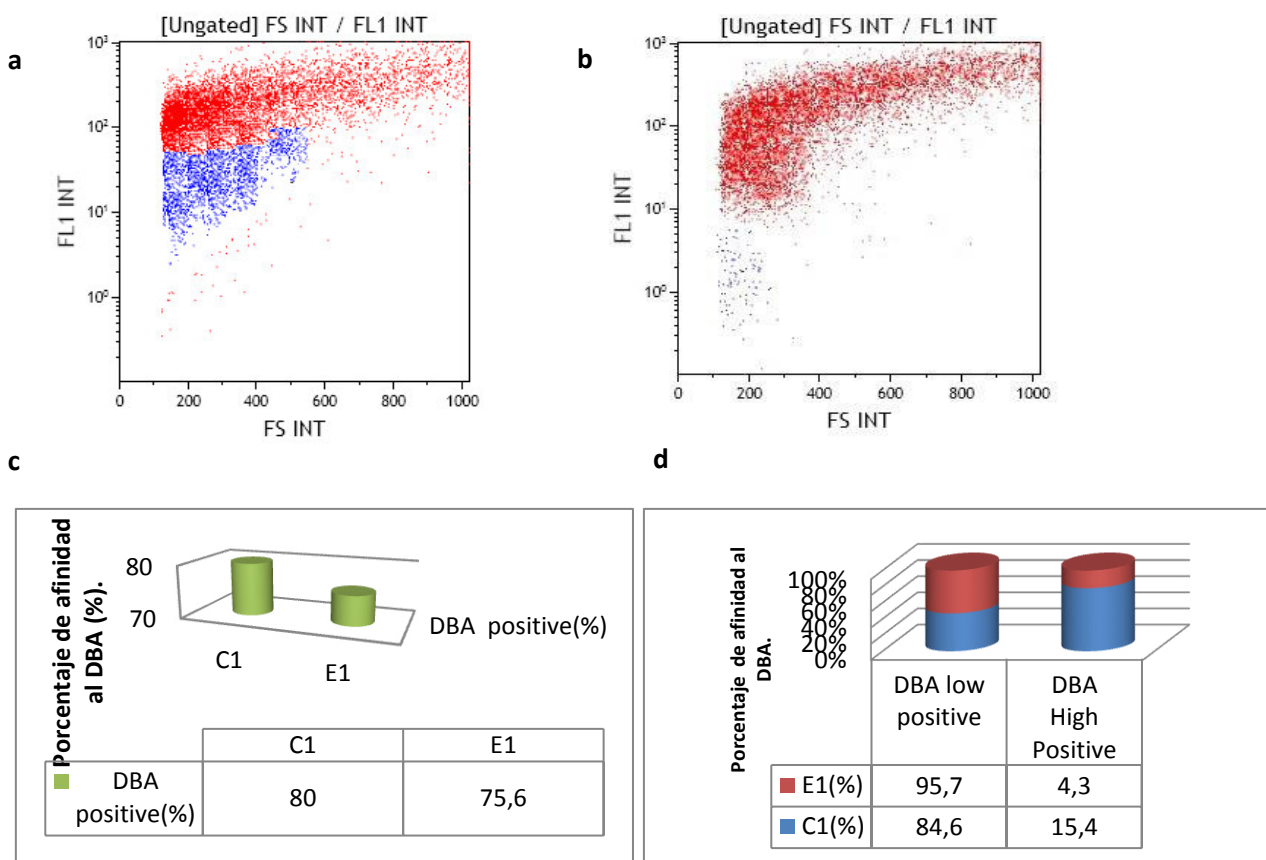


Fig. N°18. (a y b) Distribución de la fluorescencia de Dolichos biflorus aglutinina (DBA) después de la tinción con DBA–fluoresceina isotiosanato (DBA–FITC).a, Células marcadas con DBA –FITC , A (rojo) y B (azul), representan las subpoblaciones de células madres espermatogoniales del Grupo V .b, Células marcadas con DBA –FITC , A y B, representan las subpoblaciones de células madres espermatogoniales del Grupo VI.(c y d) Porcentaje de células madres espermatogoniales positivas al DBA.(c) Porcentaje de células positivas al DBA.(d)Subpoblaciones A y B . Porcentaje de las subpoblaciones con alta afinidad (barra roja) y baja afinidad (barra azul).

VI. DISCUSIÓN

El presente estudio es el primer reporte del efecto de los campos magnéticos de baja frecuencia en células madre espermato goniales en grupos de ratones de edad temprana (4dpp) expuestos durante 10 días a CM, ratones de edad adulta (35dpp) expuestos a CM durante 35 días y un grupo de desarrollo *in vivo*, luego de exposición a campos magnéticos durante 10 días.

Las investigaciones en modelos experimentales no muestran patrones comunes, en cuanto a la intensidad, frecuencia de los campos magnéticos y la dosis de exposición.

Los posibles efectos adversos de los CM-ELF sobre la salud han sido estudiados en modelos animales y humanos en las últimas décadas. Sin embargo, se han producido resultados contradictorios respecto a la alteración de las funciones reproductivas y de la espermatogénesis. Estudios anteriores mostraron que la exposición a CM-ELF no indujo efecto adverso sobre la espermatogénesis y la capacidad reproductiva en experimentos con humanos y animales (Ryan BM *et al.*, 1999; Lundsberg *et al.*, 1995; Kowalczyk *et al.*, 1995; Heredia Rojas *et al.*, 2004).

En el 1998 Furuya *et al.* sugiere que la exposición a largo plazo a un ELF magnético campo (1,0 mT) tenía un posible efecto sobre la proliferación y diferenciación de las espermato gonias.

Para la identificación de las células madres espermato goniales de tipo A, se utilizó el marcador DBA-FITC en los grupos de estudio. En el 2006 Nash, *et al.*, describió que Dolichos biflorus agglutinin (DBA), reconoce a los epítomos de glicano en la superficie de las células madre embrionaria de murino.

En el 2012, Izadyar aisló y caracterizó células madre espermato goniales de tipo A usando los marcadores DBA-FITC y c-kit en bovino. En los resultados de citometría de

flujo, observó que dentro de la población positiva aparecieron dos subpoblaciones positivas (A y B), describiendo las células madres espermatogoniales pequeñas y largas, concordando con lo encontrado en los 6 grupos de estudio (Figuras 13,14 ,15 y 16).

En nuestro estudio se observó que los efectos de los campos magnéticos a edad temprana grupo I (4dpp), el daño apoptótico es más severo que cuando se exponen animales adultos grupo VI (77dpp), esto es evidenciado en la concentración celular y en la cantidad de células positivas al DBA lo que significaría que la exposición al campo magnético sí estaría afectando la formación de células madre espermatogoniales.

No existen estudio de los efectos de los campos magnéticos a edades tempranas en reproducción pero si se tiene estudios en leucemia, según la ICNIRP los estudios sugieren que en una población de niños expuesta a campos magnéticos promedios en exceso de 0,3 a 0,4 mT, el doble de niños podría desarrollar leucemia comparada a una población con exposiciones más bajas. La leucemia infantil se presenta anualmente en 4 de cada 100.000 niños. Los estudios sin embargo no indican un riesgo semejante para otro tipo de cáncer en niños o de cualquier tipo de cáncer en adultos.

La apoptosis celular, en las células madre espermatogoniales aisladas de ratones expuestos a OEM, evidencia el efecto inmediato en la disminución de la concentración y la viabilidad; dado que las células han experimentado una disminución en su concentración ,debido un proceso de daño oxidativo y apoptosis celular producido por los campos magnéticos.

La apoptosis celular encontrada se contrasta con lo encontrado por Lee *et. al*, 2004, que demostró que la exposición a un campo magnético de 60 Hz y 14 u T, inducía la apoptosis en células germinales de ratón.

La apoptosis también llamada muerte celular programada es un fenómeno que controla la producción de espermatozoides, esto sugiere que las células genéticamente anormales son eliminadas espontáneamente como un mecanismo de defensa durante la espermatogénesis (J. Blanco Rodriguez, 1998).

Estudios recientes describieron que para inducir la apoptosis celular en células germinales testiculares la dosis de exposición mínima es de 20 u T ,60 Hz durante ocho semanas o 14 u T durante 16 semanas en ratones adultos (Kim *et al*, 2009).En contraste en exposición ocupacional en tiempos de exposición corta a 50 Hz y ELF-MF, no se encontraron efectos negativos en la espermatogénesis de ratas adultas (W. Duan *et. al*, 2013).

En las células madre espermatogoniales de los ratones expuestos a OEM, el efecto inmediato fue una disminución drástica de la concentración celular y la viabilidad, a los 73 dpp los grupos II y IVA fueron sacrificados, no se observaron diferencias significativas .Esto también fue evidenciado por Kaijun Liu *et. al* ,2014 ;él observó que en células espermáticas expuestas a 1800 MHz tenía un efecto protector, es decir, el daño oxidativo y la apoptosis celular producida por la exposición a OEM , genera un mecanismo endógeno de reparación celular llamado autofagia por la cual se da la degradación y el reciclamiento de componentes celulares en los lisosomas , este proceso es esencial para el mantenimiento de la homeóstasis celular, en condiciones de muerte y estrés celular ,bajo estas condiciones la autofagia es una respuesta de defensa ante el estrés celular y el daño a organelas .La autofagia nos explicaría el aumento de la concentración de las células madre, como un mecanismo de respuesta ante el estrés oxidativo y apoptosis producida por la exposición a campos magnéticos.

La movilidad espermática se vio afectada en los ratones que fueron expuestos a edad temprana, debido posiblemente a un daño temprano en las células madre espermatogoniales, Valdivia, *et al* en el 2014, encontraron que la exposición durante 35 días en ratones adultos guarda relación con el incremento de la expresión del gen

CATSPER1 en 1031 veces más. La relación entre la familia del gen CATSPER, y su función en los canales de calcio ,está envuelta en el proceso de maduración espermática , la capacitación y la interacción entre el espermatozoide y el ovocito, además al cruzarse ratones expuestos con hembras no expuestas , se evidencio que hay un retraso en el desarrollo embrionario y una disminución en el número de crías.

VII. CONCLUSIONES

La exposición a campos magnético de baja frecuencia disminuyó la viabilidad y concentración de las células madre espermatogoniales en ratones de edad temprana.

La exposición crónica a campos magnéticos de baja frecuencia a ratones de edad adulta no les afecte significativamente.

Las células madre espermatogoniales de ratones expuestas a campos magnéticos de baja frecuencia son afectados principalmente en edad temprana existiendo un programa de recuperación endógena (autofagia) que mantiene la fertilidad de los individuos expuestos durante su adultez.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Blanco-Rodriguez 1998, "A matter of death and life: the significance of germ cell death during spermatogenesis," International Journal of Andrology, vol. 29, no. 5, pp. 13–31.

Brinster RL 2002 Germline stem cell transplantation and transgenesis. Science, 296:2174–2176.

Brownell AG 1977 Cell surface carbohydrates of preimplantation embryos as assessed by lectin binding. J Supramol Struct ;7:223–234.

De Rooij DG 1998 Stem cells in the testis International Journal of Experimental Pathology ,79 67–80

De Rooij, Dirk G 2001. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. Reproduction, vol. 121, no 3, p. 347-354.

De Vita, D. Cavallo, I. Raganella, P. Eleuteri, M.G. Grollino, and A. Calugi. 1995. "Effects of 50 Hz magnetic fields on mouse spermatogenesis monitored by flow cytometric analysis," Bioelectromagnetics, 1995 vol. 16, no. 5, pp. 330–334.

Duan W, C. Liu, H. Wu 2013, "Effects of exposure to extremely low frequency magnetic fields on spermatogenesis in adult rats," Bioelectromagnetics.

Ellen .G and Herman .T 2007: Is there a clinical future for spermatogonial stem cells? Curr.Stem Cell.Res.Ther.pp 2: 189-195

Furuya .H, Aikawa .H, Hagino .T, Yoshida. T, Sakabe .K 1998. Flow cytometric analysis of the effects of 50 Hz magnetic fields on mouse spermatogenesis Bioelectromagnetics.

García, P. Álvarez; Toledo, B. Martínez. 2009 Prevención de riesgos frente a radiaciones no ionizantes en fisioterapia. Fisioterapia, vol. 31, no 4, p. 143-150.

Gargett CE 2007: Review article: stem cells in human reproduction. *Reprod.Science*.pp 14: 405-424

Heredia-Rojas JA, Caballero-Hernandez de, Rodriguez-De La Fuente AO, Ramos-Alfano G, Rodriguez-Flores LE.2004 Lack of alterations on meiotic chromosomes and morphological characteristics of male germ cells in mice exposed to a 60 Hz and 2.0 mT magnetic field. *Bioelectromagnetics*.2004, 25: 63–8

Hogan B, Beddington R, Constantini F, Lacy 1994. Manipulating the embryo mouse. Cold Spring Laboratory Press. New York. p. 19 -109.

Izadyar, F., Spierenberg, G. T., Creemers, I. B., Den Ouden, K., & De Rooij, D. G. 2012 Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction*,124(1), 85-94.

INCTEL-UNI 2015 Instituto Nacional De Investigación y Capacitación de Telecomunicaciones .

Kim, Y.,Kim ,H., Lee et al., “Effects of 60 Hz 14 μ T magnetic field on the apoptosis of testicular germ cell in mice,” *Bioelectromagnetics*, vol. 30, no. 1, pp. 66–72, 2009.

Kowalczyk, C. I., Robbins, L., Thomas, J. M., & Saunders, R. D 1995 Dominant lethal studies in male mice after exposure to a 50 Hz magnetic field. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. , 328(2), 229-237.

Lee, J. S., Ahn, S. S., Jung, K. C., Kim, Y. W., & Lee, S. K 2004 Effects of 60 Hz electromagnetic field exposure on testicular germ cell apoptosis in mice. *Asian Journal of Andrology*, 6(1), 29-34.

Lundsberg, L. S., Bracken, M. B., & Belanger, K 1995 . Occupationally related magnetic field exposure and male subfertility. *Fertility and sterility*,1995, 63(2), 384-391.

McClean, D. J., Johnston, D. S., Russell, L. D., & Griswold, M. D 2001 Germ cell transplantation and the study of testicular function. *Trends in Endocrinology & Metabolism*,12(1), 16-21.

McClean, D. J., Russell, L. D., & Griswold, M. D. 2002 Biological activity and enrichment of spermatogonial stem cells in vitamin A-deficient and hyperthermia-exposed testes from mice based on colonization following germ cell transplantation. *Biology of reproduction*, 66(5), 1374-1379.

Nash, R., Neves, L., Faast, R., Pierce, M., & Dalton, S. 2006 The lectin Dolichos biflorus agglutinin recognizes glycan epitopes on the surface of murine embryonic stem cells: a new tool for characterizing pluripotent cells and early differentiation. *Stem Cells*,25(4), 974-982.

Piquemal M Interacción EMF y estructura de hormigón armado 2006. Revista EcoHabitar 18,32-35

Repacholi, M. H. 1998 Low-level exposure to radiofrequency electromagnetic fields: Health effects and research needs. *Bioelectromagnetics*, 19(1), 1-19.

Requejo Carlos 1998 Estrés de alta tensión: Contaminación electromagnética, Editorial Didaco , España

Ryan, B. M., Symanski, R. R., Pomeranz, L. E., Johnson, T. R., Gauger, J. R., & McCormick, D. L.1999 Multigeneration reproductive toxicity assessment of 60-Hz magnetic fields using a continuous breeding protocol in rats. *Teratology*,59(3), 156-162.

Rietze RL, Valcanis H, Brooker GF et al. 2001 Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* ;412:736 –739.

Schrans-Stassen, B. H., van de Kant, H. J., de Rooij, D. G., & van Pelt, A. M. 1999. Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. *Endocrinology*, 140(12), 5894-5900.

Tegelenbosch RA and De Rooij DG 1993 A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse Mutation Research. 290 193–200

Valdivia,M,Paredes,M ,Temoche,H ,Celiz,H ,Levano G ,V.Cruz. 2014 Análisis de la expresion del gen CatSper W en ratones subfértiles expuestos a campos magnéticos de baja frecuencia XXIII Reunión Científica ICBAR-UNMSM .Agosto , pág 110

Wartiovaara J, Lehtonen E, Virtanen I. 1978 Lectin binding in early mouse embryos. Med Biol ;56:393–397.

WHO 2010 Environmental Health Criteria 238 EXTREMELY LOW FREQUENCY FIELDS.

Wilson, A., & Trumpp, A. 2006 Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. Nature Reviews Immunology, 6(2), 93-106.

Wu TC, Wan YJ, Damjanov I. 1983 Fluorescein-conjugated Bandeiraea simplicifolia lectin as a marker of endodermal, yolk sac, and trophoblastic differentiation in the mouse embryo. Differentiation 24:55–59.

Yan, Wei; Suominen, Janne; Toppari, Jorma. 2000 Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro. Journal of cell science, vol. 113, no 1, p. 161-168.

IX.ANEXOS.

I-Viabilidad de células madre espermatogoniales.

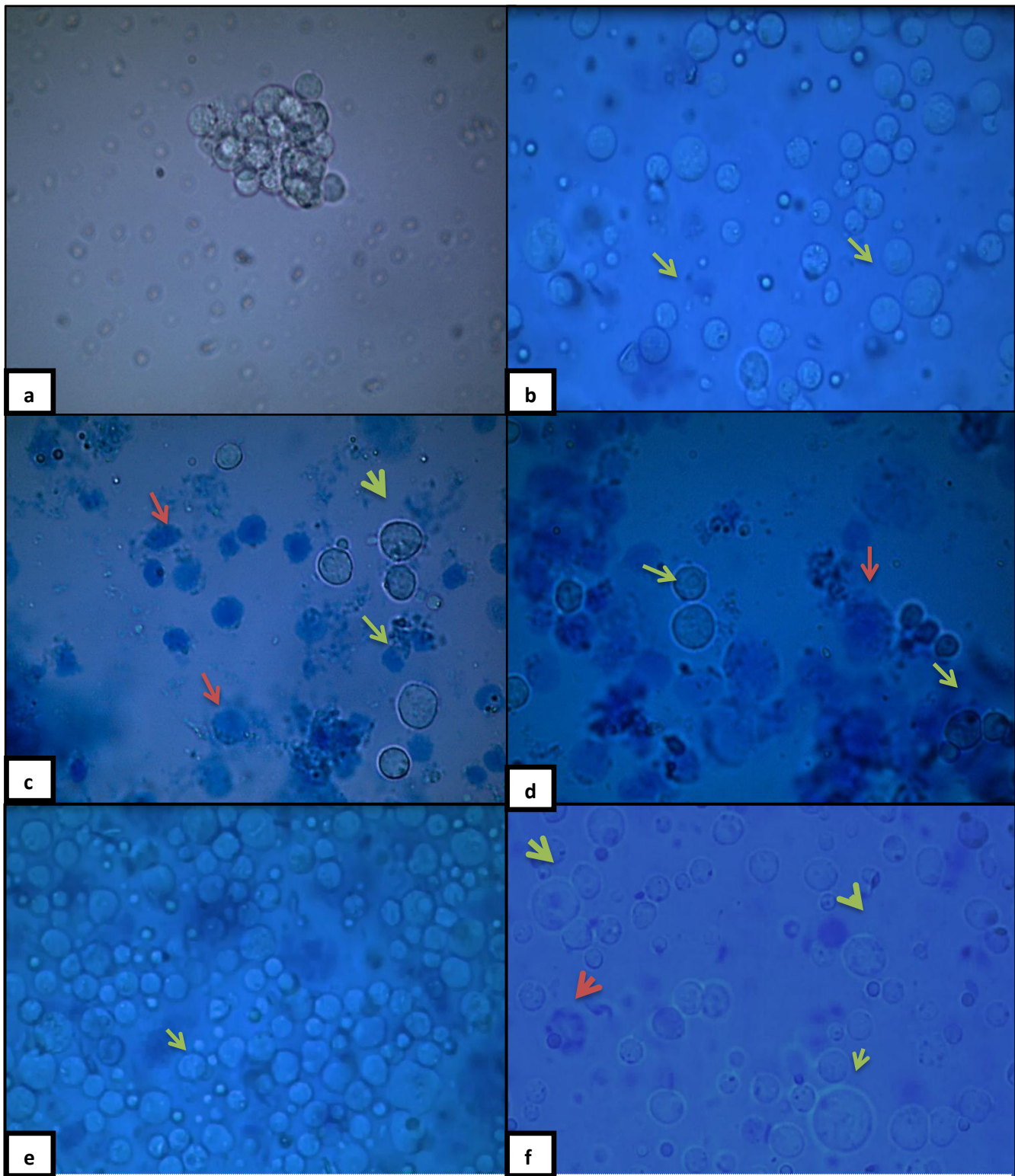


Fig. Nº 1 Viabilidad de las células madre espermátogoniales. a y b . Cumulo de células madre de ratones sin exposición a campos magnéticos .c, d, e y f .Flechas verdes: señalan células madre espermátogoniales vivas. Flecha roja: señala células madre espermátogoniales muertas (aumento: 400x).

II-ANALISIS ESTADISTICO

I. Datos completos de la concentración y la viabilidad de las células

madres de los grupos I, II, III y IV.

1. Concentración de las células madre.

Concentración de células madre (células /ml x10 ⁶)					
Grupo I n=5	Grupo II n=5	Grupo III n=5	Grupo IV n =5	Grupo V n=5	Grupo VI n=5
21,25	12,5	6	30	8	3
26,38	10,38	17	17,5	11	15
26	7,376	29	11	24	15
27	13,625	8,5	11,5	32	16
27,5	16,85	12	20	51	16

2. Viabilidad de las células madre.

Viabilidad de células madre (%)			
Grupo I n=5	Grupo II n =5	Grupo III n =5	Grupo IV n =5
50	40	91	75
60	30	74	74
65	45	70	87
70	50	63	64
50	45	68	80

Resumen de datos.

Las valores promedios obtenidos para la concentración y vitalidad evaluados se muestran a continuación en la tabla N ° 1.

Tabla N° 1: Promedio de concentración y vitalidad de los grupos I y II.

	Grupo I n =5 14dpp	Grupo II n =5 14dpp	Grupo III n =5 73dpp	Grupo IV n =5 73dpp	Grupo V n =5 77dpp	Grupo VI n =5 77dpp
Concentración n (células x10⁶/ ml)	25,62 ± 2,51	12,15 ± 3,55	14,50± 9,09	18,00± 7,74	25,52±17, 39	13± 5,6
Viabilidad (%)	59,00± 8,94	42,00± 7,58	73,20± 10,71	76,00± 8,46	87±7,58	56± 11,40

Los valores se expresan en promedio desviación estándar .

p<0,05 , indica diferencias significativas

2. Datos de la mediana y desviación estándar .

GRUPO		CONCENTRACION	VITALIDAD
G1	N	5	5
	Mediana	26,3800	60,0000
	Desv. típ.	2,51284	8,94427
G2	N	5	5
	Mediana	12,5000	45,0000
	Desv. típ.	3,54655	7,58288
G3	N	5	5
	Mediana	12,0000	70,0000
	Desv. típ.	9,09670	10,70981
G4	N	5	5
	Mediana	17,5000	75,0000
	Desv. típ.	7,73789	8,45577
G5	N	5	5
	Mediana	24,0000	90,0000
	Desv. típ.	17,39828	7,58288
G6	N	5	5
	Mediana	15,0000	60,0000
	Desv. típ.	5,61249	11,40175

3. datos estadísticos usando la prueba de ANOVA

Tabla de ANOVA

			Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
CONCENTRACION * GRUPO	Inter-grupos	(Combinadas)	907,378	5	181,476	2,197	,088
	Intra-grupos		1982,870	24	82,620		
	Total		2890,248	29			
VITALIDAD * GRUPO	Inter-grupos	(Combinadas)	6582,667	5	1316,533	15,452	,000
	Intra-grupos		2044,800	24	85,200		
	Total		8627,467	29			

II. Datos completos de los parámetros espermáticos de los espermatozoides epididimarios de los grupos III y IV.

1. Concentración espermática.

Concentración espermática (10^6 espermatozoides por ml)	
Grupo III n =5	Grupo IV n =5
20	13
32	73
39	24
21	58
21	54

2. Vitalidad espermática.

Vitalidad espermática (%)	
GRUPO III n =5	GRUPO IV n =5
91	62
99	81
98	68
98	93
98	99

3. Movilidad espermática.

Movilidad espermática (%)	
GRUPO III n =5	GRUPO IV n =5
54	28
57	26
67	22
65	30
69	32

4. Integridad de membrana (HOST)

HOST(%)	
GRUPO III n =5	GRUPO IV n =5
72	70
72	68
62	74
62	50
68	60

5 .Datos de la mediana y desviación estándar

GRUPOS		CONCENTRACION	VITALIDAD	MOVILIDAD	HOST
GIII	Media	26,6000	96,8000	62,4000	67,2000
	N	5	5	5	5
	Desv. típ.	8,50294	3,27109	6,54217	5,01996
GIV	Media	44,4000	80,6000	27,6000	64,4000
	N	5	5	5	5
	Desv. típ.	24,98600	15,78924	3,84708	9,52890
Total	Media	35,5000	88,7000	45,0000	65,8000
	N	10	10	10	10
	Desv. típ.	19,94019	13,72791	19,02630	7,33030

6. Datos estadísticos usando la prueba de ANOVA

Tabla de ANOVA

			Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
CONCENTRACION * GRUPOS	Inter-grupos	(Combinadas)	792,100	1	792,100	2,274	,170
	Intra-grupos		2786,400	8	348,300		
	Total		3578,500	9			
VITALIDAD * GRUPOS	Inter-grupos	(Combinadas)	656,100	1	656,100	5,047	,055
	Intra-grupos		1040,000	8	130,000		
	Total		1696,100	9			
MOVILIDAD * GRUPOS	Inter-grupos	(Combinadas)	3027,600	1	3027,600	105,125	,000
	Intra-grupos		230,400	8	28,800		
	Total		3258,000	9			
HOST * GRUPOS	Inter-grupos	(Combinadas)	19,600	1	19,600	,338	,577
	Intra-grupos		464,000	8	58,000		
	Total		483,600	9			

II. Datos completos de la concentración y la viabilidad de los espermatozoides epididimarios de los grupos V y VI

1. Concentración espermática

Concentración espermática (10^6 espermatozoides por ml)	
Grupo III n =5	Grupo IV n =5
100	164
100	76
25	84
76	254
73	177

2. Vitalidad espermática

Vitalidad espermática (%)	
GRUPO V n =5	GRUPO VI n =5
90	60
80	75
75	80
98	75
98	80

3. Movilidad espermática.

Movilidad espermática (%)	
GRUPO V n =5	GRUPO VI n =5
90	90
90	85
98	90
70	80
65	75

4. Integridad de membrana (HOST)

HOST(%)	
GRUPO III n =5	GRUPO IV n =5
70	80
90	75
75	65
85	80
90	75

5. Datos de la mediana y desviación estándar .

Informe					
GRUPO		CONCENTRACION	VITALIDAD	MOVILIDAD	HOST
GV	Media	74,8000	79,0000	82,6000	82,0000
	N	5	5	5	5
	Desv. típ.	30,63821	12,44990	14,27585	9,08295
GVI	Media	151,0000	74,0000	84,0000	75,0000
	N	5	5	5	5
	Desv. típ.	73,43024	8,21584	6,51920	6,12372
Total	Media	112,9000	76,5000	83,3000	78,5000
	N	10	10	10	10
	Desv. típ.	66,53228	10,28753	10,48862	8,18196

6. Resumen de datos.

Grupos de estudio	Grupo III n =5	Grupo IV n =5	Grupo V	Grupo VI	Valor de p
Concentración (espermatozoides x10⁶/ ml)	26,60 ± 8,50	44,40 ± 24,99	74,8±30,64	151 ±73,43	p>0,05
Viabilidad (%)	96,80 ± 3,27	80,60± 15,7	79± 12,45	74± 8,21	p>0,05
Movilidad (%)	62,40± 6,54	27,60±3,85	82 ±14,27	84 ±6,52	p<0,05
HOST (%)	67,20±5,02	64,4±9,53	82 ±9.09	85± 6,13	p>0,05

